SÉRIE : C
N° D'ORDRE 112
N° DE SÉRIE : 41

THESE

présentée

devant L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

pour obtenir

Le Grade de Docteur Es-Sciences Naturelles

par

Jean CITHAREL

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MÉTABOLISME AZOTÉ DES ALGUES MARINES.

Composition azotée de quelques espèces communes des côtes Nord de la Bretagne et étude de certains aspects du métabolisme de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa* (Linné) Tandy.

Soutenue le 1er Avril 1971 devant la Commission d'Examen

M. S. VILLERET	Président
Mlle M. GOAS	Examinateurs
M. F. MAGNE	
M. P. JOUAN	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552709_0034

SÉRIE : C

N° D'ORDRE 112

N° DE SÉRIE : 41

THESE

présentée

devant L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

pour obtenir

Le Grade de Docteur Es-Sciences Naturelles

par

Jean CITHAREL

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MÉTABOLISME AZOTÉ DES ALGUES MARINES.

Composition azotée de quelques espèces communes des côtes Nord de la Bretagne et étude de certains aspects du métabolisme de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa* (Linné) Tandy.

Soutenue le 1er Avril 1971 devant la Commission d'Examen

M. S. VILLERET	Président
Mlle M. GOAS	Examinateurs
M. F. MAGNE	
M. P. JOUAN	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE RENNES

U.E.R. issues de la FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. POISSON R.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

Melle CHARPENTIER M.
M. GUERINDON J.
M. METIVIER M.
M. GIORGIUTTI I.
M. BRUNEL A.
M. TOUGERON J. C.
M. MIGNOT A.

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. LEGOUPIL J.
M. HOUDEBINE J.
M. EUVRARD D.
M. NEDELEC J. C.
M. VERJUS J. P.
M. TRILLING L.
M. FERRAND D.
M. GUIVARC'H Y.
M. KEANE M. (M. C. associé)
M. GILDELAMADRID (Prof. associé)

Physique

M. VACHER M.
M. VIGNERON L.
M. LE BOT J.
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN S.
M. LE MONTAGNER S.
M. MEVEL J. Y.
M. MEINNEL J.
M. REGENSTREIF E.
M. BRUN P.
M. LE ROUX E.
M. DUBOST

M. GUIDINI
M. HAEUSLER C.
M. ARQUES P. Y.
M. DECAMPS E.
M. NUSIMOVICI M. A.

Chimie

M. VENE J.
M. LE MOAL H.
M. LEVAS E.
M. PELTIER D.
M. PRIGENT J.
M. JOUAN P.
M. FOUCAUD A.
M. LANG J.
M. CARRIE R.
M. GUERILLOT C.
M. KERFANTO M.
M. DABARD R.
M. GRANDJEAN D.
M. LUCAS J.
M. DUVAL J.
M. MARTIN G.

Zoologie

M. RICHARD G.
M. MAILLET P.
M. BOISTEL J.
M. RAZET P.
M. FOLLIOT R.
M. ALLEGRET P.
M. MANIEY J.
M. JOLY J.
M. POSTEL (Professeur associé)
M. LEFEUVRE J.C.

Botanique

M. VILLERET S.
M. CLAUSTRES G.
Melle GOAS M.
Melle GOAS G.
Mme LEMOINE C.
M. TOUFFET

Géologie

M. COGNE J.
Melle DURAND S.
M. PHILIPPOT A.
M. BOILLOT G.
M. HAMEURT J.

Le Secrétaire Général de l'Université

M. BOURDIGUEL R.

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été poursuivies au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de RENNES.

Monsieur le Professeur S. VILLERET m'a accueilli dans son laboratoire, me permettant ainsi de réaliser une carrière scientifique. Il est à l'origine de ce travail, et il en a suivi le développement avec un intérêt constant. Au cours des années, et au moment de rédiger ce texte, ses conseils et ses encouragements ont été pour moi une aide précieuse. Il m'a fait l'honneur de bien vouloir présider le jury qui doit juger cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments les plus reconnaissants.

Mademoiselle M. GOAS, Professeur à l'Université de RENNES, m'a, en toute circonstance, réservé un accueil très bienveillant. Elle m'a constamment prodigué ses conseils et ses encouragements. Ce travail lui doit beaucoup. Je suis heureux de lui exprimer ici ma profonde et sincère gratitude.

Monsieur F. MAGNE, Professeur à l'Université de RENNES, m'a toujours témoigné une grande bienveillance. Il a aimablement accepté de revoir le texte de ce mémoire, me faisant bénéficier de ses suggestions et de ses critiques. Il m'est très agréable de trouver ici l'occasion de lui exprimer ma plus vive reconnaissance.

Monsieur P. JOUAN, Professeur à l'Université de RENNES, m'a accordé de grandes facilités de travail dans son laboratoire. Ses conseils m'ont été très profitables pour la rédaction de ce travail, qu'il a eu l'amabilité de bien vouloir juger. Je lui adresse ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Monsieur A. BRUNEL, Professeur à l'Université de TOULOUSE, s'est intéressé à ce travail, me faisant bénéficier de ses vastes connaissances en Physiologie végétale. Je le remercie très sincèrement et très vivement, et je regrette beaucoup qu'il ne puisse, aujourd'hui, occuper dans le jury la place qu'il m'avait fait le grand honneur d'accepter.

Aux travaux pratiques du certificat de Physiologie Végétale Approfondie, d'abord comme élève, puis comme assistant, j'ai pu apprécier plusieurs années durant la grande gentillesse et les qualités d'enseignante de Mademoiselle G. GOAS, Professeur à l'Université de RENNES. Elle m'a initié au travail de laboratoire, et imprégné de cet indispensable esprit de rigueur scientifique. Au laboratoire, elle m'a consacré de précieux moments et donnés de nombreux conseils. Qu'elle veuille bien accepter l'expression de ma plus grande gratitude.

J'exprime ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur R. GAUTHERET, qui a accepté de présenter mes notes préliminaires à l'Académie des Sciences.

Messieurs Dr. E.G. YOUNG (National Research Council, Halifax, Canada) et Dr. A. HAUG (Institut of Seaweeds Research, Trondheim, Norway), se sont intéressés à ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

A Dinard, Mademoiselle M.L. PRIOU et Monsieur R. LAMI m'ont toujours accueilli avec une grande amabilité et m'ont permis l'accès à la bibliothèque et à l'herbier d'Algues marines du Laboratoire maritime du Museum National d'Histoire Naturelle. Je tiens à les en remercier.

Je ne peux oublier tous ceux qui m'ont apporté leur aide au cours de ce travail. Je remercie particulièrement Mademoiselle S. SAMPEREZ et Monsieur J. BOISSEAU, du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de RENNES, et Mademoiselle P. AUBRY, pour tout son dévouement au moment de la première impression de ce mémoire.

INTRODUCTION

Les Algues marines constituent un groupe systématique original. Elles se distinguent en particulier par leur morphologie, leur biologie, leur mode de vie. Malgré l'intérêt que leur confère cette originalité, l'étude de leur biochimie et de leur physiologie a progressé moins vite que celle des autres végétaux. Il est surprenant de constater notamment le peu d'attention accordée à leur composition et à leur métabolisme azoté.

LA COMPOSITION AZOTEE DES ALGUES MARINES

FOGG (1953), SCHMID (1959), FOWDEN (1962), PELLEGRINI (1968) et LEVRING et coll. (1969) ont exposé, dans des analyses bibliographiques successives, les résultats des différents travaux qui concernent la composition azotée des Algues marines. Seuls les caractères principaux de cette composition, tels qu'ils ressortent des recherches les plus récentes, seront donc résumés dans les lignes suivantes. D'autres données, en rapport direct avec certains problèmes abordés dans ce travail, seront utilisées lors de discussions de détails, plus loin dans le texte.

La plupart des renseignements relatifs à la composition azotée de ces Thallophytes ont été acquis par le dosage de la fraction azotée totale, l'isolement de quelques peptides et la recherche de leur constitution, l'identification et le dosage des acides aminés libres et combinés. Ces dernières années toutefois, d'autres substances azotées (nucléotides, nucléoprotéines, vitamines, ...) ont aussi fait l'objet de quelques travaux.

La fraction azotée totale a été déterminée pour de nombreuses Algues marines. Les pourcentages observés varient entre 0,5 et 7 ^{o}/o du poids sec, environ. Ils sont généralement plus forts chez les Chlorophycées et les Rhodophycées. Chez une même espèce, les valeurs de ces pourcentages diffèrent en fonction des diverses parties du thalle, du sexe des organes reproducteurs, de la croissance et de la saison.

Les composés azotés solubles représentent la plus faible partie de la fraction azotée totale (10 à 40 % : FOWDEN, 1962 ; PELLEGRINI, 1968). Les substances solubles les mieux connues sont les peptides de faibles poids moléculaires et les acides aminés libres.

Les peptides ont retenu l'attention de quelques chercheurs. Certains d'entre eux ont pu isoler plusieurs de ces composés et préciser leur constitution chimique (HAAS, 1958). D'autres, à l'occasion de travaux plus récents, ont établi la composition en acides aminés des fractions peptidiques totales.

De nombreux acides aminés ont été détectés par LEWIS et GONZALVES et par LEWIS (1959-1965) dans les hydrolysats d'extraits de peptides totaux, obtenus à partir de plusieurs espèces d'Algues marines des côtes de l'Inde. La proline, la phénylalanine, les leucines, l'ornithine, l'arginine, la lysine, l'histidine, l'alanine, la glycine, la méthionine, la valine, la sérine et la tyrosine sont les acides aminés les mieux représentés. L'homocystine et le tryptophanne ne sont pas identifiés, probablement par suite de leur destruction dans les conditions expérimentales (hydrolyse chlorhydrique). Des différences qualitatives et quantitatives existent entre les compositions des différents échantillons.

Une étude analogue, entreprise sur neuf Algues méditerranéennes (NASR et coll., 1967) a donné des résultats comparables. Tous les acides aminés déterminés dans les hydrolysats des protéines totales des espèces examinées sont présents dans les fractions peptidiques hydrolysées. Certains d'entre eux existent dans pratiquement tous les extraits : acide aspartique, acide glutamique, alpha-alanine, valine, leucines, thréonine, lysine, arginine, histidine. D'autres, par contre, ne sont retrouvés que chez un nombre réduit d'espèces, voire même chez une seule : sérine, cystéine, méthionine, ornithine, tyrosine, proline. Le tryptophanne et la cystine sont totalement absents. En plus de ces variations qualitatives, NASR et coll. signalent des différences quantitatives entre les échantillons.

Certains auteurs pensent (COULSON, 1953 ; JONES, 1956) que les Algues marines diffèrent des Algues d'eau douce et des plantes terrestres par le fait qu'elles possèdent davantage de peptides que d'acides aminés libres et d'amides. HAAS et HILL (1933) ont émis l'hypothèse que la présence de ces peptides serait le résultat d'une déviation du métabolisme azoté, provoquée par des dessiccations trop intenses et trop prolongées, ou par une luminosité insuffisante.

Les acides aminés libres ont été très longtemps négligés dans les travaux qui se rapportent à la composition azotée des Algues marines. Les résultats les plus nombreux ont été acquis ces quinze dernières années, et les progrès continuels réalisés par les techniques chromatographiques font que la liste des publications qui traitent de ce sujet ne cesse de s'accroître. La plupart des recherches ont porté sur les acides les plus communs, ceux qui entrent dans

la composition des protéines. Les premières analyses (1) n'ont permis d'identifier qu'un nombre réduit d'acides aminés, l'alanine, l'acide glutamique et l'acide aspartique essentiellement. Mais la majorité de ceux que l'on rencontre à l'état libre chez les plantes supérieures ont maintenant été retrouvés chez les Algues marines. De plus, quelques auteurs, des Japonais en particulier (ITO et coll., 1963-1967), se sont appliqués à détecter et à isoler des acides aminés rares ou nouveaux.

Les amino-acides qui atteignent les concentrations les plus importantes dans la fraction aminée libre sont, bien souvent, l'alanine, l'acide glutamique et l'acide aspartique, ce qui explique qu'ils sont les premiers à avoir été signalés. Mais des variations qualitatives et quantitatives, parfois très marquées, ont été observées entre les compositions des espèces analysées (2). La proline, les leucines, l'arginine, la citrulline, la taurine, peuvent ainsi prendre une place prépondérante parmi les acides aminés libres de certaines Algues.

D'autres variations, en fonction de la biologie et de la saison notamment, affectent la composition en acides aminés libres des Algues marines.

LEWIS et GONZALVES (1962) ont constaté des différences dans le nombre et les concentrations des acides aminés libres, entre des individus cystocarpiques et tétrasporiques d'*Agardhiella robusta*. Une autre étude (1962) leur a révélé des variations analogues, en fonction de la saison, chez *Enteromorpha prolifera f. capillaris* et *Ulva lactuca var. rigida*. Les auteurs notent en particulier que certains acides aminés (l'asparagine, l'arginine, l'acide gamma-aminobutyrique) présentent de forts pourcentages à des époques données de l'année, alors qu'ils ne sont détectés qu'à l'état de traces à d'autres moments. D'une façon générale, il y a une augmentation de la quantité globale des acides aminés libres au cours de la croissance des deux Algues vertes, le maximum des concentrations étant atteint au moins de mars.

KURIYAMA (1961) a observé une évolution saisonnière comparable dans la composition en acides aminés de Rhodophycées japonaises. D'après cet auteur, la variation traduit des différences qui interviennent dans les processus métaboliques en relation avec le cycle vital.

Les composés azotés insolubles, essentiellement de nature protéique, constituent la partie la plus importante (60 à 90 %) de la fraction azotée totale des Algues marines. Les protéines, en raison des difficultés que présente leur extraction, demeurent très peu connues.

(1) ERICSON et SJOSTROM, 1952 ; COULSON, 1953 ; CHANNING et YOUNG, 1953 ; JONES, 1956.

(2) LEWIS et GONZALVES, 1959-1962 ; LEWIS, 1962-1965 ; HONG, 1964 ; TAKAGI et coll., 1964 ; NASR et coll., 1967 ; LANDSBERGER et coll., 1969.

SMITH et YOUNG (1953-1955) ont entrepris une étude sur l'efficacité de différents solvants pour extraire les protéines de *Fucus vesiculosus, Ascophyllum nodosum, Chondrus crispus, Rhodymenia palmata* et *Ulva lactuca.* La meilleure solubilisation étaient obtenue dans de la soude diluée, mais cette solution ne pouvait dissoudre plus de 50 % environ des protéines. Un travail analogue, effectué par COULSON (1955) sur *Rhodymenia palmata, Fucus vesiculosus, Laminaria cloustoni, L. saccharina, L. digitata, Pelvetia canaliculata* et *Ascophyllum nodosum* a fourni des résultats comparables. Cet auteur a discuté les problèmes soulevés par cette mauvaise extraction ; la formation d'un complexe alginate-protéine la rend très difficile et non quantitative. SMITH et YOUNG avaient signalé les mêmes difficultés. DUNCAN et coll. (1956) ont obtenu une solubilisation maximum dans le carbonate de sodium à 0,25 % chez *Cladophora rupestris, Ulva lactuca, Laminaria digitata* et *Rhodymenia palmata.*

Les seuls renseignements que l'on possède concernent la composition globale en acides aminés d'hydrolysats de poudres d'Algues marines, dont les composés solubles ont été, ou non, préalablement extraits, ou de fractions protéiques plus ou moins purifiées. Cette composition est sensiblement la même que celle des Algues d'eau douce et des plantes supérieures (FOGG, 1953 ; FOWDEN, 1952 ; PELLEGRINI, 1968).

Plusieurs chercheurs ont accordé une attention particulière aux chromoprotéines, à cause de leur intérêt pour la classification de ces Thallophytes, et de leur rôle physiologique.

Leur solubilité dans l'eau et leur stabilité en solution aqueuse a facilité l'étude des chromoprotéines. Ce sont les seules protéines algales que l'ont ait pu obtenir à l'état purifié (FOWDEN, 1962). Leurs propriétés physicochimiques ont pu être définies (SVEDBERG et LEWIS, 1928 ; SVEDBERG et KATSURAI, 1929 ; SVEDBERG et ERIKSSON, 1932 ; SWINGLE et TISELIUS, 1951). Des travaux plus récents ont permis de mettre en évidence de nouvelles phycobilines et d'établir leurs caractères physicochimiques (HAXO et coll., 1955 ; AIRTH, 1955 ; BLINKS et AIRTH, 1957 ; O'HEOCHA, 1965).

D'autres substances azotées ont été signalées chez les Algues marines : la méthylamine et la triméthylamine (KAPELLER-ADLER et coll., 1930-1931 ; HAAS et HILL, 1931) et, plus récemment, la vitamine B_{12} (ERICSON et LEWIS, 1953 ; KARLSTROM, 1963), la biotine (LARSEN, 1961), l'acide indolacétique (AUGIER, 1965). Les acides nucléiques et les nucléoprotéines ont aussi fait l'objet d'un certain nombre de recherches au cours de ces dernières années (de VITRY, 1965 ; NASATIR et BROOKS, 1966). Les nucléotides qui interviennent dans la synthèse des premiers glucides élaborés lors de la photosynthèse par des Phéophycées et Rhodophycées ont été isolés et identifiés : le guanosine diphosphorique et l'uridine diphosphorique (PERCIVAL et Mc DOWELL, 1967).

LE METABOLISME AZOTE DES ALGUES MARINES

Les différents aspects du métabolisme azoté des Algues marines demeurent à peu près inconnus. Des difficultés techniques, liées en particulier à leur culture pure au laboratoire et à la mise en évidence des activités enzymatiques, sont probablement à la base de ces lacunes dans nos connaissances. Toutefois, la présence de certaines enzymes a pu être reconnue : allantoïnase et allantoïcase (VILLERET, 1958), transaminases (JACOBI, 1957 ; NAKAMURA et coll., 1968), nitrate réductase (TAKAJI et MURATA, 1954-1955), ornithine transcarbamylase (REUTER, 1961), protéinases (TAZAWA et MIWA, 1953). L'utilisation de plusieurs substances azotées (sels ammoniacaux, nitrates, urée, acides aminés, vitamines) a été démontrée. (3) L'hypothèse d'ENGELMANN (1884), suivant laquelle les chromoprotéines jouent un rôle important dans la photosynthèse des Algues, a été confirmée par plusieurs travaux récents (HAXO et BLINKS, 1950 FRENCH et YOUNG, 1952 ; YOCUM et BLINKS, 1954). Quelques aspects du métabolisme des acides nucléiques ont été précisés chez *Acetabularia mediterranea* (de VITRY, 1965).

*

* *

Ce résumé des principales connaissances actuelles sur la composition et le métabolisme azotés des Algues marines montre que les travaux consacrés à ces Thallophytes sont peu nombreux, comparés à ceux qui ont été réalisés chez les autres végétaux. Jusqu'en 1960, le nombre des espèces étudiées était très limité. Mais leur liste s'est beaucoup allongée ces dix dernières années. Toutefois, la diversité des méthodes employées, comme l'absence regrettable de précisions concernant les caractéristiques écologiques, morphologiques et surtout

(3) TATEWAKI et PROVASOLI, 1964 ; HUTNER et PROVASOLI, 1964 ; DROOP, 1959 ; PUISEUX-DAO, 1962 ; ITO et coll., 1960 ; OLSZEWSKA et BRACHET, 1960-1961 ; BEAUDRIMONT, 1960 ; JACOBI, 1962 ; NASR et coll., 1968 ; CHAUDURI et SPENCER, 1968.

biologiques des échantillons étudiés, rendent les résultats difficilement comparables et peu utilisables en Physiologie végétale. Par ailleurs, aucune recherche n'a porté sur un métabolisme particulier.

L'objet de ce travail était d'étudier certains aspects du métabolisme azoté des Algues marines des côtes bretonnes. Les renseignements apportés par les études antérieures, pour les raisons qui viennent d'être données, ne pouvaient lui servir de base. Une analyse préliminaire de la composition azotée de ces végétaux était donc nécessaire.

La première partie de ce mémoire sera donc consacrée à l'étude de la composition azotée. Pour être représentative, cette étude devait porter sur un éventail systématique assez large ; pour être homogène, elle devait s'appuyer sur un échantillonnage réalisé dans des conditions précises, comparables pour toutes les espèces. Certains constituants : sels ammoniacaux, nitrites, nitrates et acides aminés libres principalement, méritaient un examen plus approfondi que celui qui leur avait été réservé auparavant.

La deuxième partie portera sur un point précis du métabolisme azoté. L'accumulation importante de certains acides aminés, notamment de la citrulline, dans la fraction azotée soluble de certaines espèces, amenait à s'interroger sur les raisons de cette accumulation. La recherche des voies de synthèse et de dégradation de la citrulline a donc été entreprise chez une Rhodophycée, *Polysiphonia lanosa* (Linné) Tandy.

PREMIERE PARTIE

LA COMPOSITION AZOTEE DES ALGUES MARINES
des côtes Nord de la Bretagne

Chapitre I. - Matériel et techniques

Chapitre II. - La composition azotée

DEUXIEME PARTIE

LE METABOLISME DE LA CITRULLINE
chez *Polysiphonia lanosa*

Chapitre I. - La synthèse de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa*

Chapitre II. - Dégradation de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa*

CONCLUSIONS GENERALES

PREMIERE PARTIE

LA COMPOSITION AZOTEE DES ALGUES MARINES

des côtes Nord de la Bretagne

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

A.- LE MATERIEL VEGETAL

1. - Lieux des récoltes
2. - Récoltes
3. - L'échantillon
4. - Préparation du matériel
5. - Les Algues étudiées

B.- LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. - Dosage de l'azote total
2. - Dosage de l'azote soluble
3. - Dosage de l'azote ammoniacal
4. - Dosage de l'azote nitrique
5. - Dosage de l'azote nitreux
6. - Chromatographie sur papier
7. - Dosage des acides aminés libres
8. - Dosage des acides aminés combinés
9. - Expression des résultats

CHAPITRE II

LA COMPOSITION AZOTEE

A.- LES DIFFERENTES FRACTIONS AZOTEES

1. - La fraction azotée totale
2. - La fraction azotée soluble
3. - L'azote minéral
    a. - L'azote ammoniacal
    b. - L'azote nitreux
    c. - L'azote nitrique
4. - La fraction aminée libre
    a. - Les Chlorophycées
    b. - Les Phéophycées
    c. - Les Rhodophycées
5. - Les acides aminés des hydrolysats de la fraction azotée insoluble

B.- DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

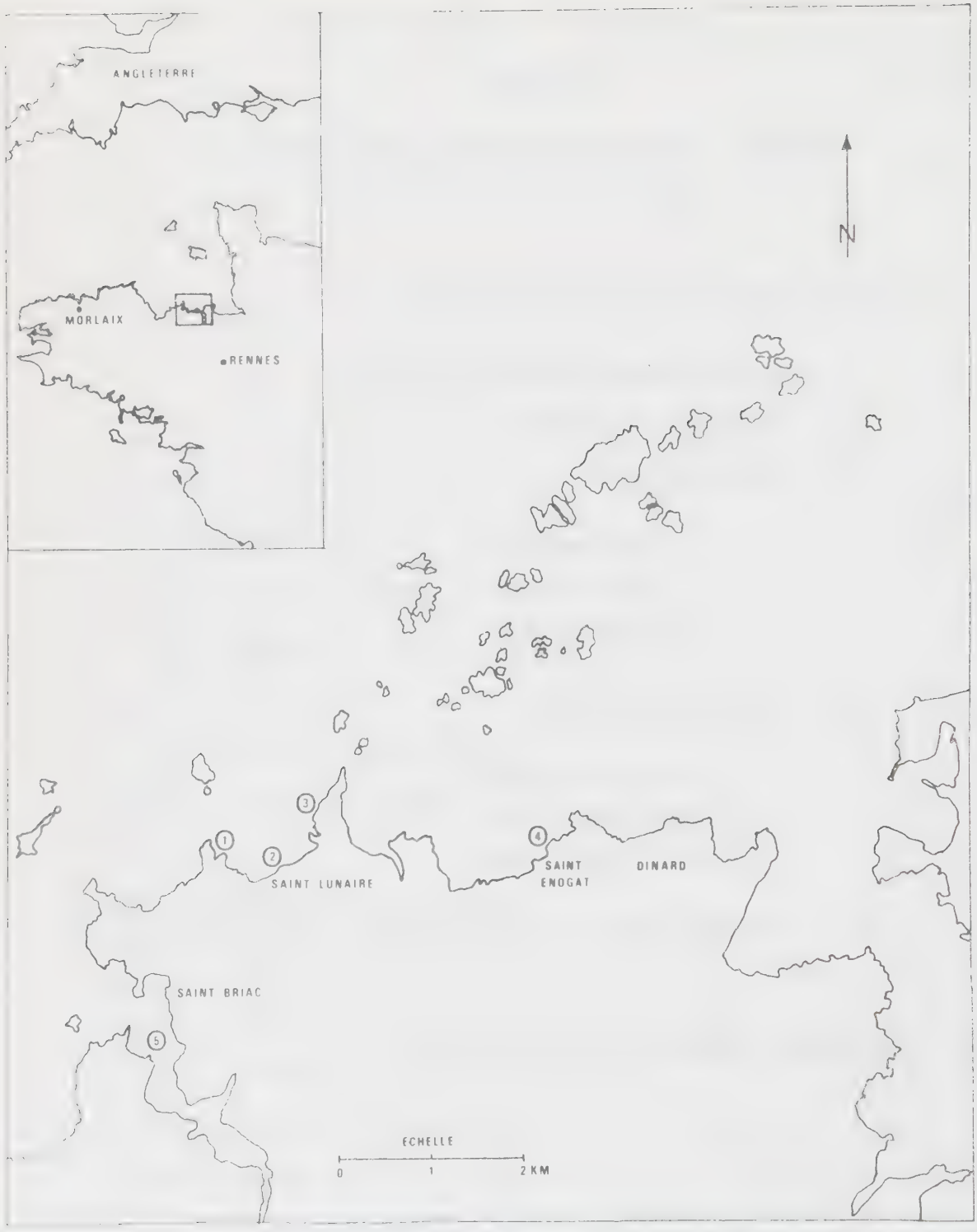


Fig. 1.- Carte de la région de Dinard (Ille-et-Vilaine), avec indication des stations de récoltes (voir p. 13).

PREMIER CHAPITRE

MATERIEL ET TECHNIQUES

A. - LE MATERIEL VEGETAL

1.- Lieux des récoltes

Pratiquement tous les échantillons ont été récoltés près de Dinard (Ille-et-Vilaine), aux endroits suivants, (Fig. 1) :

- la pointe de la Garde Guérin (station 1),
- la région située entre la plage de Longchamp à l'Ouest et la pointe du Décollé à l'Est (station 2),
- la pointe du Décollé (station 3),
- la plage de Saint-Enogat, dans sa partie Ouest (station 4),
- l'estuaire du Frémur, à Saint-Briac (station 5).

Les quatre premières stations sont du type rocheux battu, la cinquième est plus abritée.

Quatre espèces proviennent des côtes Nord du Finistère (de la région de Morlaix) : *Fucus muscoides* (anse de Térénez), *Monostroma grevillei, Alaria esculenta* et *Himanthalia elongata* (Roscoff).

2.- Récoltes

Les Algues sont récoltées à marée basse, dans des populations homogènes et denses. Après un rinçage rapide à l'eau de mer, les échantillons, placés dans des sachets de matière plastique pour éviter toute dessiccation, sont mis dans une boîte isotherme contenant de la glace (la glace se trouve au fond de l'enceinte, et une planche d'isorel évite tout contact direct entre elle et les végétaux), et rapportés au laboratoire.

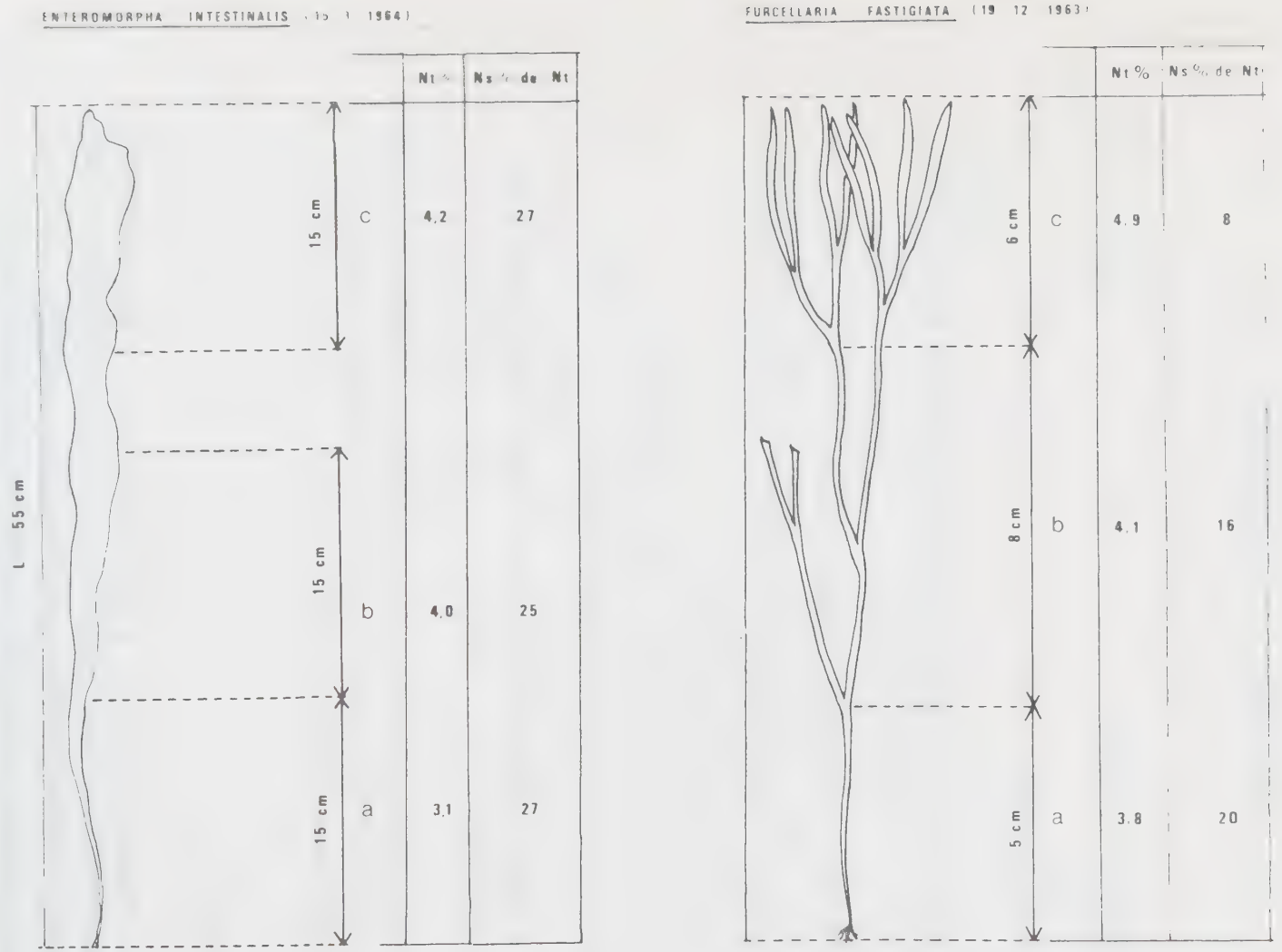


Fig. 2 - Variations de la composition azotée en fonction des différentes parties du thalle. Chez *Enteromorpha intestinalis*, espèce à appareil végétatif simple, les différences entre les valeurs de l'azote total (Nt, exprimé en pourcentages du poids sec) et de l'azote soluble (Ns, exprimé en pourcentages de Nt), sont peu accusées. Chez *Furcellaria fastigiata*, dont le thalle est nettement plus différencié, les composés azotés solubles, plus particulièrement, présentent des concentrations très variables d'une région du thalle à l'autre.

3.- L'échantillon

Dans toute étude physiologique, les résultats, comme les conclusions qui peuvent en être tirées, dépendent de l'échantillon. Selon MARTIN-PREVEL (1967), cet échantillon présente un double caractère, qualitatif et quantitatif. Le premier concerne la signification biologique de l'échantillonnage ; il implique la connaissance de "la nature des informations contenues dans l'échantillon prélevé, par rapport à l'ensemble des caractères de l'objet d'étude". L'aspect quantitatif relève plutôt de la statistique. Il permet de définir "la précision des informations apportées par rapport aux données réelles, dont on n'obtiendra jamais qu'une évaluation".

Suivant la nature des renseignements que l'on désire obtenir, MARTIN-PREVEL distingue trois types principaux d'échantillonnages :

- l'échantillonnage "corrélatif",
- l'échantillonnage "représentatif",
- l'échantillonnage "descriptif".

- *L'échantillonnage "corrélatif" :* exemple, le diagnostic foliaire. Les valeurs données par l'échantillon doivent évoluer en corrélation aussi étroite que possible avec tel ou tel caractère de la plante : la fonction de nutrition par exemple, dans le cas du diagnostic foliaire. On utilise comme index de ce que l'on cherche à mesurer, une portion de l'objet à étudier, choisie en fonction de sa sensibilité et de sa fidélité à l'égard des variations de la grandeur mesurée.

- *L'échantillonnage "représentatif" :* il répond au besoin d'établir un bilan complet, représentatif de la plante entière ou d'une partie de celle-ci. Il doit fournir une moyenne. Il est donc nécessaire que l'échantillon recueilli neutralise la diversité du végétal dont il est tiré. Cela peut être réalisé :

- en cherchant, par une étude soigneuse des gradients, une zone qui reflète exactement, pour les caractères étudiés, la composition moyenne de l'organe ou du groupe d'organes à échantillonner.

- en éliminant les effets des gradients sans mesurer ces derniers. La méthode théoriquement parfaite est de détruire tous les gradients possibles en homogénéisant l'objet à échantillonner, par broyage et mélange soigneux.

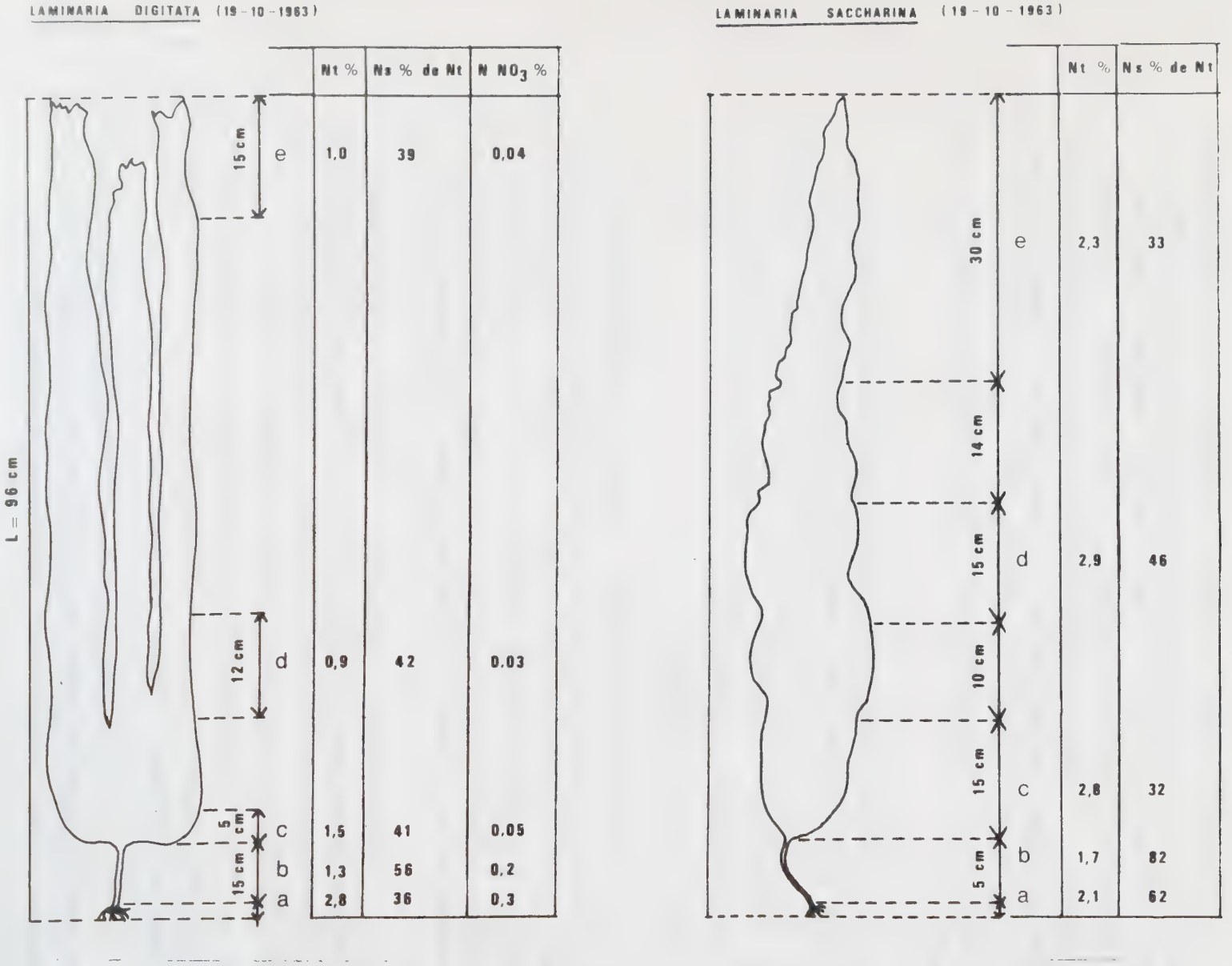


Fig. 3 - Variations de la composition azotée en fonction des différentes parties du thalle. Aux diverses parties de l'appareil végétatif des Laminaires correspond une composition azotée particulière. Il est intéressant de noter, par exemple, les pourcentages d'azote total plus élevés dans les zones de croissance (zone stipofrondale), des proportions d'azote soluble bien plus importantes dans les stipes et, chez *Laminaria digitata*, une concentration beaucoup plus forte de nitrates dans les crampons et le stipe.

- *L'échantillonnage "descriptif" :* les valeurs moyennes ne sont pas toujours suffisantes. Il est parfois nécessaire de connaître la dispersion des valeurs autour de leur moyenne ; on a donc besoin d'un échantillonnage qui reflète toute la variabilité de l'objet d'étude, en général une population. On est donc ramené au problème statistique du choix des individus représentatifs, mais au lieu de traiter l'information contenue dans l'échantillon globalement, pour en tirer une moyenne, on utilise des mesures individuelles, ou par classes d'individus, pour décrire le mieux possible les caractères de dispersion de la population.

Le choix de la méthode d'échantillonnage dépend donc essentiellement de la nature du travail entrepris et des caractères du végétal à étudier (morphologie, biologie). Comme ces caractères sont influencés, d'une manière généralement importante, par les facteurs du milieu, ceux-ci doivent être pris en considération au moment de réaliser l'échantillon. Enfin, pour que ces caractères (biochimiques notamment) soient conservés tels qu'ils sont lors du prélèvement, il est nécessaire que le matériel soit fixé dans des conditions appropriées.

L'étude préliminaire de la composition azotée visait à obtenir, pour toutes les espèces étudiées, des résultats qui renseignent sur la valeur moyenne de chaque fraction azotée. Il était nécessaire que ces valeurs soient représentatives d'un état bien déterminé des Algues analysées. Cet état devait être défini par des caractères morphologiques et biologiques précis, comparables d'une Algue à l'autre.

Pour "représenter" l'Algue, il était possible de prélever soit le thalle entier, soit une fraction de celui-ci, à condition que la zone retenue reflète exactement la composition moyenne de la plante. Mais, pratiquement, la fragmentation de l'appareil végétatif n'était pas réalisable pour les espèces les plus petites. Chez les plus grandes, les Laminaires et *Alaria* plus particulièrement, les thalles présentent des différences morphologiques individuelles ainsi que des gradients biochimiques (MOSS, 1950 ; CHANNING et YOUNG, 1952 ; JACOBI, 1954 ; JONES, 1956 ; LARSEN et HAUG, 1961 ; et Fig. 2 et 3) qui rendent difficile et aléatoire le choix d'un tel fragment. De plus, un échantillon constitué dans de telles conditions n'aurait pas été comparable à ceux réalisés à l'aide de thalles entiers. Par contre, l'analyse de ces thalles entiers, soigneusement homogénéisés, permettait d'obtenir une valeur moyenne, caractéristique de chaque espèce.

Il était également indispensable que ces thalles présentent tous le même stade de développement, afin de tenir compte des variations importantes qui interviennent dans la composition chimique des Algues en fonction de leur croissance (JACOBI, 1954 ; JONES, 1956 ; CITHAREL et VILLERET, 1964).

Mais des difficultés existent lorsqu'il s'agit de définir "l'âge" de certaines Algues pluriannuelles. En effet, des individus morphologiquement semblables d'une même espèce, récoltés à une même date au sein d'une même population, peuvent présenter des stades de développement très différents (AUSTIN, 1960). Ce fait, comme les variations individuelles qui affectent la forme du thalle de beaucoup de ces Thallophytes, nécessite, plus encore que chez les plantes supérieures qui sont toujours plus homogènes à cet égard, la constitution d'un échantillon qui comporte le plus grand nombre possible d'individus. Pratiquement, ce nombre est limité par la taille des Algues.

Compte tenu de tous ces faits, les échantillons ont été réalisés de la façon suivante :

- **les thalles ont été récoltés entiers**

- **le stade de développement retenu correspond à la taille maximum atteinte par chaque espèce dans la station de récolte (taille déterminée par rapport à celle des individus fructifiés qui poussent au même endroit et dont la croissance, pour la majorité des espèces, est terminée). Seuls les individus non fructifiés ont été conservés. Physiologiquement, ce stade se traduit par la fin de la croissance ; il précède la formation des éléments reproducteurs. A ce moment, l'Algue présente le maximum de substances azotées (JONES, 1956).**

- **les échantillons comprenaient au moins dix individus pour les espèces de taille relativement grande (Fucacées), 50, 100 ou plus de 100 individus pour les plus petites Algues (*Enteromorpha compressa, Cladophora, Scytosiphon, Ceramium, Polysiphonia, ...).* Exceptionnellement, pour *Laminaria digitata, L. saccharina* et *Alaria esculenta,* espèces de très grandes tailles, les analyses ont porté sur une poudre obtenue à partir d'un seul individu.**

- **les Algues ont été prélevées dans des stations voisines (Fig. 1), à des dates aussi rapprochées que possibles (Janvier à Avril 1964 pour la majorité d'entre elles).**

- **Seuls les individus en place dans leurs stations naturelles, au sein de populations denses et apparemment homogènes, ont été retenus.**

TABLEAU I

*Variations des valeurs du pourcentage d'azote total, sur la base du poids sec, chez 10 individus d'*Enteromorpha intestinalis, Bifurcaria rotunda *et* Furcellaria fastigiata

Algues	*Enteromorpha intestinalis* (31.1.1962) Longueur moyenne : 62 cm Largeur moyenne : 2,3 cm		*Bifurcaria rotunda* (15.11.1961) Longueur moyenne : 31 cm Nombre moyen de ramifications : 12		*Furcellaria fastigiata* (19.11.1962) Longueur moyenne : 22,5 cm Nombre moyen de ramifications : 7	
	Azote total en %	Erreur absolue, par rapport à la moyenne	Azote total en %	Erreur absolue, par rapport à la moyenne	Azote total en %	Erreur absolue, par rapport à la moyenne
1	3,45	1,4 %	1,62	7,4 %	5,12	3,2 %
2	3,45	1,4 %	1,48	1,2 %	5,36	1,3 %
3	3,57	2,0 %	1,52	1,2 %	5,34	0,9 %
4	3,40	2,8 %	1,54	2,4 %	4,80	8,8 %
5	3,30	5,6 %	1,43	4,2 %	5,28	0,2 %
6	3,83	2,3 %	1,45	3,0 %	5,32	0,5 %
7	3,54	1,1 %	1,49	0,6 %	5,75	8,3 %
8	3,56	1,7 %	1,55	3,0 %	5,37	1,4 %
9	3,57	2,0 %	1,44	3,6 %	5,35	1,1 %
10	3,35	4,2 %	1,48	1,2 %	5,30	0,2 %
Azote total moyen en %	3,50		1,50		5,29	
Erreur moyenne		2,4 %		2,8 %		2,6 %

La validité d'un échantillonnage réalisé dans les conditions qui viennent d'être définies a été vérifiée par l'analyse de trois échantillons de *Cladophora pellucida*, constitués au même moment, à partir des individus d'une même population (100 individus par échantillon). Les résultats ont montré que la somme des acides aminés libres de chaque échantillon (166,3 - 164,1 et 165,7 µM pour 1 g de poids sec) variait dans une limite inférieure à 1 % , par rapport à la moyenne calculée à partir de ces trois sommes (165,4 µM).

Afin de connaître la précision des valeurs acquises à l'aide d'un échantillon réalisé à partir de dix individus seulement, une analyse individuelle de la composition azotée totale a été réalisée pour trois espèces différentes : *Enteromorpha intestinalis, Bifurcaria rotunda* et *Furcellaria fastigiata*. Les individus ont été sélectionnés suivant les critères d'échantillonnage qui viennent d'être précisés. Les résultats (Tableau 1) montrent que l'erreur absolue, par rapport à la moyenne est inférieure ou égale à 2 % pour six individus d'*Enteromorpha,* quatre de *Bifurcaria* et sept de *Furcellaria,* sur dix analysés chez chaque Algue. L'erreur absolue maximum atteint 5,6 % chez la première espèce, 7,4 chez la seconde et 8,8 chez la troisième. L'erreur moyenne, pour chaque plante, est inférieure à 3 % . Ces différences qui persistent d'un individu à l'autre montrent qu'il est très difficile de sélectionner sur le terrain des échantillons absolument comparables d'une même espèce d'Algue marine. Les caractères morphologiques, en particulier, sont insuffisants pour pratiquer cette sélection.

En ce qui concerne l'analyse individuelle, une étude de BAARDSETH et HAUG (1953) a mis en évidence des variations importantes entre les compositions de 55 *Laminaria digitata* des côtes norvégiennes.

Les résultats de ces auteurs montrent que les pourcentages, exprimés sur la base du poids sec, sont compris entre 15,9 et 33,4 % pour les cendres, et entre 17,7 et 25,1 % pour l'acide alginique. Ces différences correspondent à une erreur absolue de 35,7 % et de 17,3 % respectivement, par rapport à la valeur moyenne. Les auteurs attribuent les variations observées à des différences de races, d'âges, de stades de développement et de facteurs extérieurs.

Il est certain que des variations affectent également la composition azotée individuelle des Laminaires bretonnes. Toutefois, en raison des précautions prises dans le présent travail pour choisir les échantillons de *Laminaria digitata, L. saccharina* et *Alaria esculenta,* l'importance de ces variations n'atteint pas celle constatée par BAARDSETH et HAUG. Les causes invoquées par ces auteurs pour expliquer les différences observées montrent bien que leurs individus étaient très dissemblables. De plus, il est possible que leur mode de stabi-

lisation du matériel soit responsable d'une grande part des variations. En effet, ils ont fixé leurs plantes par simple dessiccation à l'air, à la température ambiante. Ce procédé est lent et il s'accompagne souvent d'une destruction de certains composés, par action enzymatique, microbienne ou fongique.

En conclusion, les valeurs obtenues dans cette étude sur la composition azotée des Algues marines des côtes bretonnes sont des moyennes, valables dans les conditions définies précédemment. Leur précision est bonne pour les échantillons qui comportent un nombre élevé d'individus (50 et plus). Pour ceux qui ne comptent qu'une dizaine de plantes, l'erreur moyenne, si l'on se réfère à l'indication apportée par l'étude individuelle de trois espèces, doit être réduite (de l'ordre de 3 %). Mais cette erreur peut être nettement plus importante pour les Laminaires et *Alaria,* pour lesquelles l'analyse a porté sur un seul individu. Les résultats acquis pour ces trois Algues sont donc donnés à titre indicatif. Les comparaisons qui sont faites entre leurs pourcentages et ceux des autres espèces comportent ainsi des réserves. Toutefois, la proportion relative des valeurs des différentes fractions azotées pour chacun de ces Thallophytes est valable et doit fournir une image juste de la composition de ces Phéophycées.

4.- Préparation du matériel

Les Algues sont triées, nettoyées et rincées à l'eau déminéralisée, plusieurs fois consécutives. Elles sont alors séchées entre deux feuilles de papier filtre, coupées en fins morceaux pour obtenir une dessiccation rapide et placées dans des boîtes de Pétri.

La dessiccation s'opère en présence de chlorure de calcium, dans une étuve à vide (Heraeus), à la température ordinaire. Dans ces conditions, après 48 heures le poids de la quasi-totalité des espèces a atteint une valeur constante.

Le matériel desséché est placé dans des tubes de verre bouchés hermétiquement, et mis au congélateur, à la température de -18^{o}C.

La pulvérisation se fait au moment des analyses, à l'aide d'un broyeur à billes (Dangoumeau).

La détermination de l'humidité résiduelle des poudres s'effectue à l'étuve à 105^{o}C, jusqu'à poids constant (sur 100 mg de poudre d'Algue environ).

Dans ces conditions, il est possible qu'une légère perte de substances très fragiles (méthylsulfure par exemple) se produise chez certaines espèces.

5.- Les Algues étudiées

72 espèces ont été retenues pour cette étude : 10 Chlorophycées, 25 Phéophycées et 37 Rhodophycées. Le chiffre qui suit le nom de chaque Algue dans la liste suivante indique le lieu de la récolte (voir page 13 et Fig.1).

CHLOROPHYCEES

ULVALES

Monostromacées

1. - *Monostroma grevillei* (Thuret) Wittrock

Ulvacées

2. - *Ulva lactuca* Linné (3)

3. - *Enteromorpha intestinalis* (Linné) Link. (5)

4. - *Enteromorpha compressa* (Linné) Greville (4)

CLADOPHORALES

Cladophoracées

5. - *Chaetomorpha aerea* (Dillwyn) Kützing (1)

6. - *Cladophora pellucida* (Hudson) S.F. Gray (4)

7. - *Cladophora rupestris* (Linné) Kützing (4)

CODIALES

Codiacées

8. - *Codium dichotomun* (Hudson) S.F. Gray (4)

9. - *Codium fragile* (Sur.) Hariot (4)

10. - *Codium bursa* (Linné) C. Agardh (4)

PHEOPHYCEES

ISOGENERATEES

SPHACELARIALES

Stypocaulacées

11. - *Halopteris scoparia* (Linné) Sauvageau (1)

SCYTOSIPHONALES

Scytosiphonacées

12. - *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Endlicher (1)

13. - *Petalonia fascia* (Müller) O. Kuntze (1)

14. - *Colpomenia peregrina* (Sauvageau) Hamel (1)

DICTYOTALES

Dictyotacées

15. - *Padina pavonia* (Linné) Gaillon (1)

16. - *Dictyopteris membranacea* (Stackhouse) Batt. (2)

17. - *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux (2)

HETEROGENERATEES

DESMARESTIALES

Desmarestiacées

18. - *Desmarestia ligulata* (Lightfoot) Lamouroux (2)

LAMINARIALES

Chordacées

19. - *Chorda filum* (Linné) Stackhouse (1)

Laminariacées

20. - *Laminaria digitata* (Linné) Lamouroux (3)

21. - *Laminaria saccharina* Lamouroux (3)

Alariacées

22. - *Alaria esculenta* (Linné) Greville

CYCLOSPOREES

FUCALES

Fucacées

23. - *Fucus spiralis* Linné (1)

24. - *Fucus vesiculosus* Linné (1)

25. - *Fucus muscoides* Cotton

26. - *Fucus ceranoides* Linné (5)

27. - *Fucus serratus* Linné (1)

28. - *Ascophyllum nodosum* (Linné) Le Jolis (4)

29. - *Pelvetia canaliculata* (Linné) Decaisne. Thu. (4)

Himanthaliacées

30. - *Himanthalia elongata* (Linné) S.F. Gray

Cystoseiracées

31. - *Halidrys siliquosa* (Linné) Lyngbye (3)

32. - *Bifurcaria rotunda* (Hudson) Papenfuss (3)

33. - *Cystoseira baccata* (Gmelin) Silva (2)

34. - *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss (3)

35. - *Cystoseira myriophylloides* Sauvageau (2)

RHODOPHYCEES

BANGIOIDEES

BANGIALES

Bangiacées

36. - *Porphyra umbilicalis* (Linné) Kützing (1)

FLORIDEES

GELIDIALES

Gélidiacées

37. - *Gelidium latifolium* (Grev.) Thuret, Bornet (3)

CRYPTONEMIALES

Dumontiacées

38. - *Dumontia incrassata* (Müller) Lamouroux (3)

39. - *Dilsea carnosa* (Schmidel) Küntze (3)

Corallinacées

40. - *Corallina squamata* (Ellis) Solander (3)

Grateloupiacées

41. - *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (3)

GIGARTINALES

Furcellariacées

42. - *Furcellaria fastigiata* (Linné) Lamouroux (2)

Rhodophyllidacées

43. - *Cystoclonium purpureum* (Hudson) Batters (2)

44. - *Calliblepharis ciliata* (Hudson) Kützing (2)

Plocamiacées

45. - *Plocamium coccineum* (Hudson) Lyngbye (3)

Sphaerococcacées

46. - *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse (1)

Gracilariacées

47. - *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (1)

Phyllophoracées

48. - *Gymnogongrus griffithsiae* (Turner) Martens (3)

49. - *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries (1)

Gigartinacées

50. - *Chondrus crispus* (Linné) Lyngbye (3)

51. - *Gigartina acicularis* (Wulfen) Lamouroux (3)

52. - *Gigartina stellata* (Stackhouse) Batters (3)

53. - *Gigartina pistillata* (Gmelin) Stackhouse (2)

54. - *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux (2)

RHODYMENIALES

Rhodyméniacées

55. - *Rhodymenia palmata* (Linné) J. Agardh (1)

Lomentariacées

56. - *Lomentaria articulata* (Hudson) Lyngbye (3)

57. - *Lomentaria clavellosa* (Turner) Gaillon (3)

58. - *Chylocladia verticillata* (Lighfoot) Blid. (3)

59. - *Chylocladia squarrosa* (Kützing) Le Jolis (1)

60. - *Gastroclonium ovatum* (Hudson) Papenfuss (3)

CERAMIALES

Céramiacées

61. - *Ceramium flabelligerum* J. Agardh (1)

62. - *Ceramium rubrum* (Hudson) C. Agardh (2)

63. - *Bornetia secundiflora* (J. Agardh) Thuret (3)

64. - *Griffithsia flosculosa* (Ellis) Batters (1)

Délesséria cées	65. - *Delesseria sanguinea* (Linné) Lamouroux	(3)
	66. - *Cryptopleura ramosa* (Hudson) Kylin	(2)
Rhodomélacées	67. - *Polysiphonia elongata* (Hudson) Harvey	(4)
	68. - *Polysiphonia lanosa* (Linné) Tandy	(4)
	69. - *Polysiphonia nigrescens* (Dillwyn) Greville	(2)
	70. - *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux	(1)
	71. - *Laurencia hybrida* (De Candolle) Lenormand	(3)
	72. - *Laurencia pinnatifida* (Hudson) Lamouroux	(3)

B. - LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

1.- Dosage de l'azote total

Cette fraction azotée a été dosée soit suivant la méthode classique du micro-Kjeldahl, avec un catalyseur au sélénium (BRUNEL, 1948), soit à l'aide de l'analyseur d'azote COLEMAN (méthode de DUMAS). Cette dernière technique offre, en plus de la rapidité et de la simplification des manipulations, l'avantage d'englober directement l'azote des nitrates dans les valeurs obtenues.

La méthode de DUMAS a été utilisée pour tous les dosages d'azote total effectués pour l'étude en fonction de la position systématique.

2.- Dosage de l'azote soluble

Les composés azotés solubles sont extraits dans l'eau distillée, à $0^{o}C$ (GUITTON, 1964). Ils sont ensuite minéralisés puis dosés suivant la tech-

nique du micro-Kjeldahl (BRUNEL, 1948), après précipitation des protéines par l'acide trichloracétique, dont la concentration finale dans l'extrait est de 2,5 % .

La valeur obtenue en calculant la différence entre les pourcentages des fractions azote total et azote soluble représente l'azote "insoluble" qui comprend, en plus de l'azote protéique, l'azote de différents composés insolubles (liés aux membranes cellulaires par exemple).

3.- Dosage de l'azote ammoniacal

La méthode de YOVANOVITCH (BRUNEL, 1948) permet de doser l'azote ammoniacal, sur une fraction aliquote de l'extrait trichloracétique obtenu suivant la technique de GUITTON (1964). Des résultats comparables ont été acquis en plaçant directement la poudre végétale dans la fiole de YOVANOVITCH.

J'ai étudié l'action de l'acide trichloracétique à 2,5 % sur les amides (glutamine et asparagine) dans les conditions expérimentales. Ces composés sont en effet susceptibles de libérer assez facilement de l'ammoniac par hydrolyse, la glutamine plus particulièrement.

TABLEAU II

Action de l'acide trichloracétique à 2,5 % sur la glutamine, à 4°C, en fonction du temps (dosage de $N\text{-}NH_3$ libéré).

Durée de l'hydrolyse	$N\text{-}NH_3$ de la glutamine dans le milieu	$N\text{-}NH_3$ libéré, en % de $N\text{-}NH_3$ de la glutamine
2 heures	1430 µg	0,13
6 heures	1430 µg	0,20
13 heures	1430 µg	0,41
28 heures	1430 µg	0,62
48 heures	1430 µg	0,83

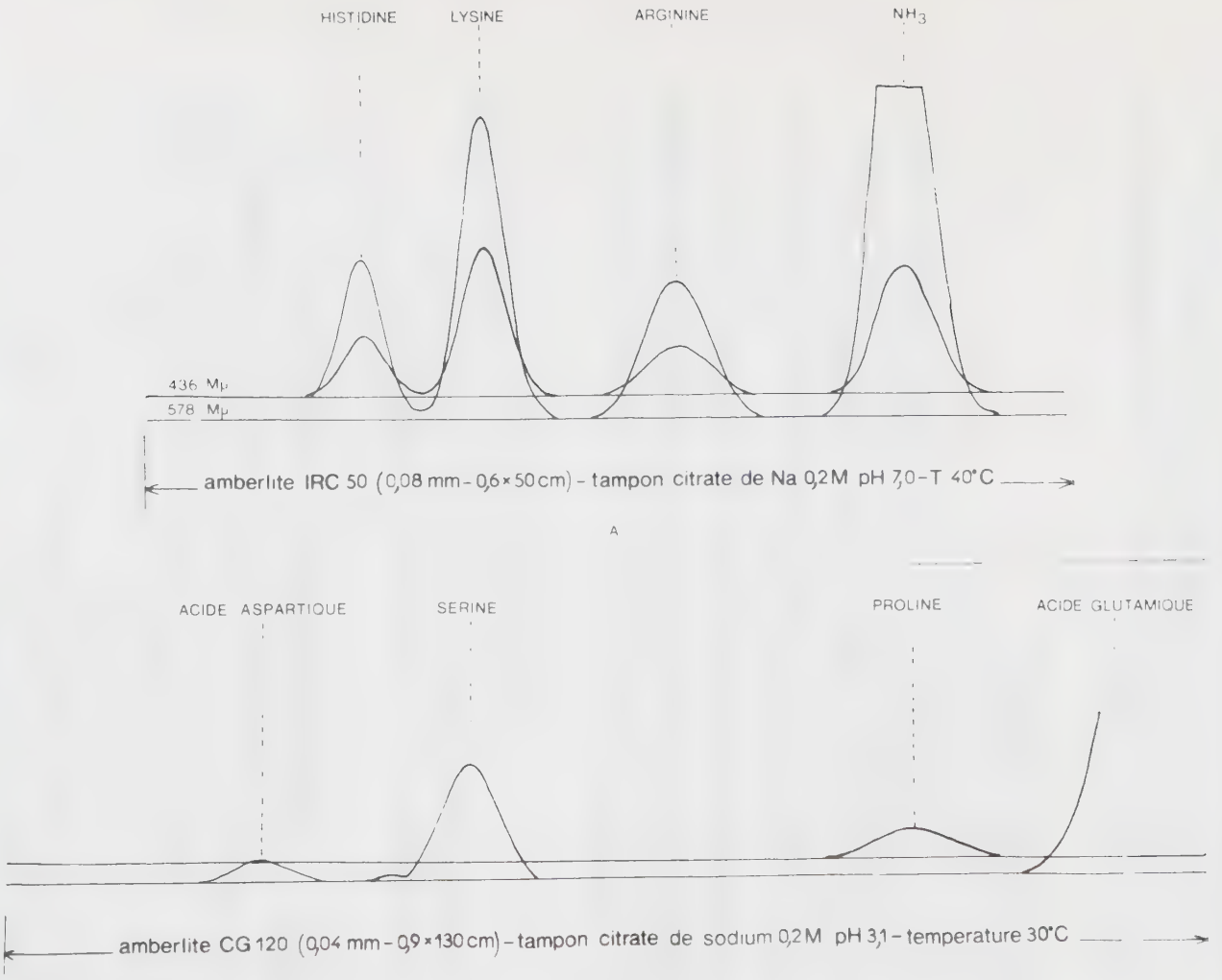


Fig. 4 - Courbe d'élution d'un mélange d'acides aminés obtenue à l'aide de l'analyseur d'acides aminés de BENDER et HOBEIN.

A. - Les acides aminés basiques

B. - Analyse à 30°C des acides aminés acides et neutres afin de séparer les pics d'élution de la proline et de la citrulline.

Le dosage de l'azote ammoniacal est toujours effectué dans les 24 heures qui suivent l'extraction. L'hydrolyse de la glutamine par l'acide trichloracétique à 2,5 °/₀ est alors, au plus, égale à 0,6 °/₀ (Tableau II). Comme la concentration des amides est faible chez les espèces étudiées, cette hydrolyse ne peut libérer qu'une quantité très réduite d'azote ammoniacal.

Analysée dans les mêmes conditions, l'asparagine s'est révélée très stable.

4.- Dosage de l'azote nitrique

Les nitrates sont également dosés sur une fraction aliquote de l'extrait trichloracétique. La technique de HUMPHRIES (1955), utilisant l'acide phénolsulfonique, permet le dosage colorimétrique de l'ion nitrique dans la solution, après élimination des chlorures sous forme de chlorure d'argent, afin d'éviter leur interférence.

5.- Dosage de l'azote nitreux

Les nitrites forment, en présence d'acide sulfanilique (à 1 °/₀ dans HCl 1,5 N) et d'alpha-naphtylamine (à 0,025 °/₀ dans l'eau) un dérivé coloré rouge utilisé pour la détermination quantitative de ces composés, sur une fraction aliquote de l'extrait trichloracétique (Méthode de GRIESS, modifiée par SNELL et SNELL, 1949).

6.- Chromatographie sur papier

Les acides aminés sont identifiés par une étude préalable en chromatographie sur papier, en deux dimensions. Les solvants utilisés sont le butanol-acide acétique-eau (40 ; 10 : 50) pour la première direction, et le phénol-eau (80 : 20) pour la seconde. Le papier employé est le WHATMAN, n° 1 ou 2.

7.- Dosage des acides aminés libres

Le dosage des acides aminés libres a été effectué à l'aide de l'analyseur automatique de BENDER et HOBEIN (HANNIG, 1959), sur une fraction aliquote de l'extrait trichloracétique dilué dans une solution tampon de pH 2,2 (GUITTON, 1964).

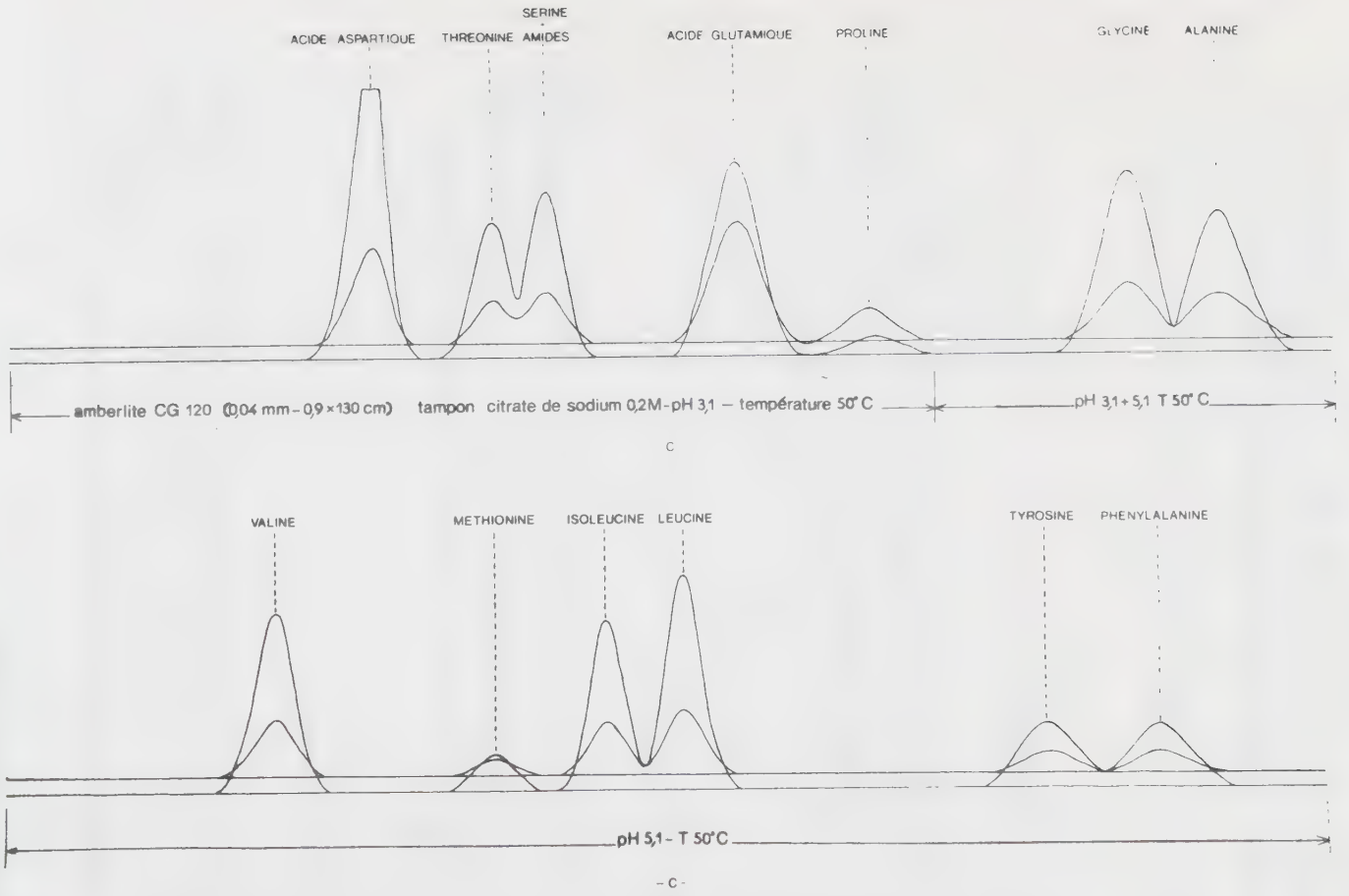


Fig. 4 - Courbe d'élution d'un mélange d'acides aminés obtenue à l'aide de l'analyseur d'acides aminés de BENDER et HOBEIN.

C. - Les acides aminés neutres et acides

Les acides aminés basiques sont séparés sur une colonne (0,6 x 50 cm) de résines échangeuses d'ions Amberlite IRC 50, d'une grosseur de grains de 0,06 à 0,08 mm. La solution tampon utilisée pour l'équilibration de la résine et pour l'élution des acides aminés est une solution 0,2 M de citrate de Na, de pH 7,0. La température d'élution est de 40°C.

Les acides aminés neutres et acides sont séparés sur une autre colonne (0,9 x 130 cm) de résines cationiques Amberlite CG 120, dont le diamètre des grains est inférieur à 0,05 mm. Après régénération par une solution de soude 0,2 N, la résine est équilibrée par une solution tampon de pH 3,10 (HCl-citrate de Na 0,2 M). Pour l'élution des acides aminés, après le passage de 210 ml de la solution de pH 3,10 sur la colonne, le pH est amené progressivement jusqu'à 5,10 (solution d'acide citrique-acétate de Na 0,2 M de pH 5,10). La température d'élution est de 50°C.

Les pics correspondant aux différents acides aminés, révélés par leur réaction à la ninhydrine, sont enregistrés à l'aide d'un photocolorimètre enregistreur, à 436 mμ pour la proline et l'hydroxyproline, et à 578 mμ pour les autres acides aminés. Les surfaces des courbes de Gauss obtenues, proportionnelles aux concentrations des différents acides dans la prise d'essai, sont mesurées par planimétrie et comparées aux valeurs obtenues avec une courbe de référence réalisée avec un mélange d'acides aminés de concentration connue.

Les figures 4-A et 4-C donnent la succession des pics des différents acides aminés après séparation sur les deux colonnes de l'appareil.

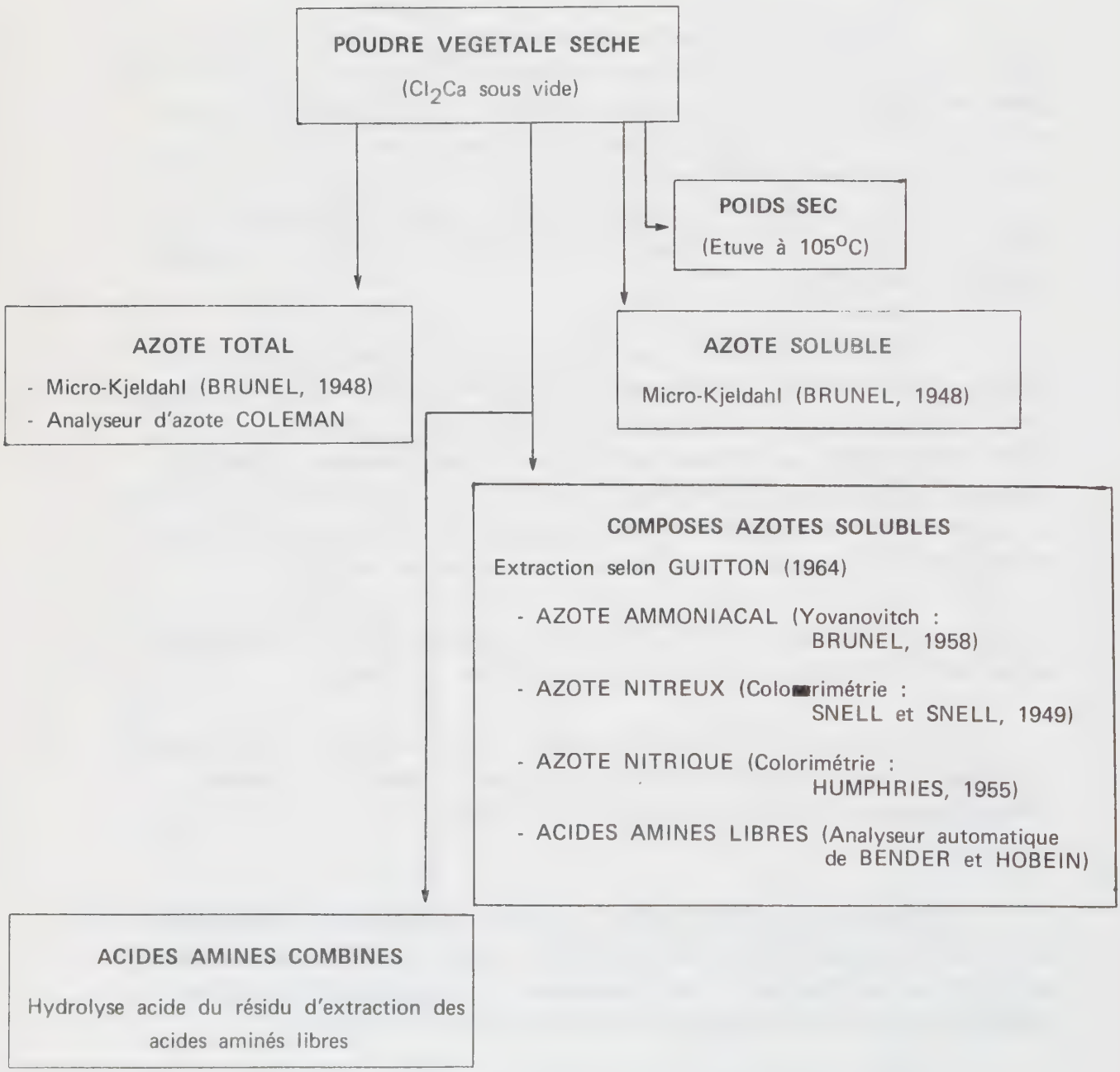
Les amides (glutamine et asparagine) sont éluées, dans les conditions habituelles d'analyse (à 50°C) en même temps que la sérine sur la colonne chromatographique. De même, la proline et la citrulline ne donnent alors qu'un seul pic.

Une analyse à 30°C permet de séparer parfaitement la proline (figure 4-B) mais la séparation des amides de la sérine n'ayant pu être obtenue dans des conditions satisfaisantes à cette température, il a été nécessaire d'adopter une technique différente pour évaluer les concentrations de ces composés :

- on effectue une première analyse dans les conditions normales. On obtient une valeur unique pour la somme "sérine + amides".

TABLEAU III

Différentes techniques analytiques utilisées pour le dosage des fractions azotées



- on réalise une hydrolyse d'une fraction aliquote de l'extrait trichloracétique par H_2SO_4 N, à 100°C, pendant trois heures (HENDERLONG et SMITH, 1966). Les amides sont hydrolysées dans ces conditions.

- l'analyse de cet hydrolysat donne, en principe, la valeur de la sérine seule, et par différence avec la somme "sérine + amides" acquise auparavant, celle des amides.

Mais cette méthode n'est pas entièrement satisfaisante, et les valeurs obtenues pour la sérine et les amides ne sont qu'indicatives. En effet, les produits de la réaction entre la ninhydrine et ces composés (sérine d'une part, amides d'autre part) n'ont pas exactement le même coefficient d'absorption. De plus, l'hydrolyse peut provoquer, d'une part, une légère destruction de la sérine libre, et d'autre part, la libération d'une certaine quantité de cet acide aminé, à partir de peptides de faibles poids moléculaires pouvant exister dans les extraits.

En outre, le passage des amides sur les résines cationiques, à température relativement élevée, peut entraîner leur hydrolyse partielle. Les valeurs obtenues pour l'acide aspartique et surtout pour l'acide glutamique sont donc peut-être supérieures à leurs concentrations réelles.

8.- Dosage des acides aminés combinés

Le résidu d'extraction de la fraction azotée soluble est recueilli quantitativement, puis séché sur chlorure de calcium dans l'étuve à vide, et pulvérisé. Une partie de la poudre (20 à 30 mg) est hydrolysée par HCl 6 N dans des tubes scellés ou dans un ballon muni d'un réfrigérant, pendant 24 heures à 100°C. Les acides aminés libérés, provenant essentiellement des protéines des Algues, sont dosés à l'analyseur automatique de BENDER et HOBEIN, après purification (passage sur résines Dowex 50, 100-200 mesh, forme H^+) et concentration de la solution à l'évaporateur rotatif, le résidu étant repris dans le minimum d'eau bidistillée. Une fraction aliquote de cette solution est diluée dans le tampon pH 2,2 pour la fixation par les résines de l'analyseur.

9.- Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sur la base du poids sec. C'est le seul mode d'expression qui pouvait permettre la comparaison entre des valeurs acquises à partir de végétaux extrêmement différents les uns des autres.

Toutefois, afin de rendre plus perceptible la proportion relative des composés azotés solubles et insolubles dans chaque échantillon, ces composés azotés solubles ont également été exprimés en pourcentages de la fraction azotée totale.

De même, pour obtenir une comparaison directe entre les quantités d'un acide aminé donné d'une Algue à l'autre, ses concentrations ont été rapportées à un gramme d'azote total pour toutes les espèces analysées.

DEUXIEME CHAPITRE

LA COMPOSITION AZOTEE

Cette étude préliminaire, il faut le rappeler ici, a été entreprise pour une double raison. Elle était, tout d'abord, nécessaire pour connaître les espèces qui possèdent des particularités biochimiques susceptibles d'être le point de départ de recherches métaboliques détaillées. Elle devait, ensuite, apporter une meilleure connaissance de la composition azotée des Algues marines.

Les résultats acquis pour les fractions "azote total", "azote soluble", "azote ammoniacal", "azote nitreux", "azote nitrique", "acides aminés libres" et "acides aminés combinés", seront exposés successivement. Un développement plus important sera accordé aux acides aminés libres, en raison de leur importance métabolique, et parce qu'ils sont encore peu connus chez les Algues marines.

La comparaison de ces résultats entre eux tentera de dégager les caractères de la composition azotée particuliers aux différents groupes et espèces étudiés.

La confrontation des données de ce travail avec celles obtenues antérieurement en différents points du globe essaiera de mettre en évidence les traits originaux de la composition azotée des Algues des côtes bretonnes.

A. - LES DIFFERENTES FRACTIONS AZOTEES

1.- La fraction azotée totale

Les valeurs des pourcentages de cette fraction azotée, étudiée chez un nombre relativement élevé d'espèces d'Algues marines, sont très variables suivant les plantes analysées. Ainsi, par exemple, PELLEGRINI (1968), pour une quarantaine d'échantillons, obtient des résultats qui varient de 0,77 à 6,56 % du poids sec.

TABLEAU IV

Valeurs de différentes fractions azotées des CHLOROPHYCEES

	Nt	Ns	Np	Ns °/o de Nt	NNO_3	NNO_2 x 10^3	NNH_3 x 10^3	Date de récolte
Monostroma grevillei	1,05	0,22	0,83	20	0,12	0,02	6,6	21.4.1964
Ulva lactuca	5,03	1,46	3,57	29	0,45	2,16	46,0	30.1.1964
Enteromorpha intestinalis	4,20	1,23	2,97	29	0,24	0,16	22,0	25.2.1964
Enteromorpha compressa	4,70	1,33	3,37	28	0,22	0,27	31,0	17.1.1964
Chaetomorpha aerea	4,72	1,13	3,59	24	0,54	2,00	41,0	30.1.1964
Cladophora pellucida	5,07	1,34	3,73	26	0,55	0,25	16,0	21.4.1964
Cladophora rupestris	5,98	1,43	4,55	24	0,29	0,39	14,0	30.1.1964
Codium dichotomum	2,42	0,63	1,79	26	0,29	0,56	35,0	30.1.1964
Codium fragile	2,47	0,31	2,16	12	0,16	0,36	59,0	14.2.1964
Codium bursa	1,23	0,15	1,08	12	0,06	0,66	52,0	18.3.1964

Les différentes fractions azotées sont exprimées en pourcentages du poids sec à 105°C.

Nt = azote total ; Ns = azote soluble ; Np = azote insoluble ; NNO_3 = azote nitrique ; NNO_2 = azote nitreux ; NNH_3 = azote ammoniacal.

TABLEAU V

Valeurs de différentes fractions azotées des PHEOPHYCEES

	Nt	Ns	Np	Ns °/o de Nt	NNO_3	NNO_2 x 10^3	NNH_3 x 10^3	Date de récolte
Halopteris scoparia	1,14	0,32	0,82	28	0,09	0,28	18,2	17.5.1965
Scytosiphon lomentaria	3,50	0,62	2,88	19	0,24	0,03	32,0	25.2.1964
Petalonia fascia	4,04	0,59	3,46	22	0,30	0,35	18,0	25.2.1964
Colpomenia peregrina	2,96	0,58	2,38	19	0,16	2,00	22,3	30.1.1964
Padina pavonia	1,52	0,34	1,18	22	0,12	0,24	38,0	15.6.1964
Dictyopteris membranacea	2,91	0,28	2,63	9	0,09	0,15	23,4	17.5.1965
Dictyota dichotoma	2,02	0,43	1,59	21	0,11	0,27	26,1	18.6.1964
Desmarestia ligulata	1,65	0,27	1,38	22	0,15	0,26	20,0	16.2.1964
Chorda filum	0,97	0,17	0,80	17	0,02	0,24	22,7	18.6.1964
Laminaria digitata	3,39	0,63	2,76	15	0,27	0,11	25,3	17.1.1964
Laminaria saccharina	4,05	0,59	3,46	14	0,23	0,43	17,4	17.1.1964
Alaria esculenta	2,69	0,35	2,34	13	0,03	0,02	19,4	21.4.1964
Fucus spiralis	2,71	0,85	1,86	31	0,09	0,46	19,9	16.2.1964
Fucus vesiculosus	3,12	0,91	2,21	29	0,13	0,30	25,8	17.1.1964
Fucus muscoides	1,72	0,60	1,12	34	0,11	0,17	20,1	21.4.1964
Fucus ceranoides	4,02	0,57	3,45	14	0,17	+	26,3	20.4.1965
Fucus serratus	2,82	0,68	2,14	24	0,37	0,27	28,1	17.1.1964
Ascophyllum nodosum	2,03	0,72	1,31	35	0,08	0,46	34,5	30.1.1964
Pelvetia canaliculata	1,96	0,71	1,25	36	0,09	0,43	18,8	17.1.1964
Himanthalia elongata	2,40	0,75	1,65	31	0,15	0,28	27,4	20.4.1965
Halidrys siliquosa	1,54	0,50	1,04	38	0,14	0,26	17,9	17.1.1964
Bifurcaria rotunda	1,67	0,59	1,08	35	0,10	0,25	12,9	17.1.1964
Cystoseira baccata	2,70	0,75	1,95	27	0,34	0,44	32,3	30.1.1964
Cystoseira tamariscifolia	2,53	0,52	2,01	20	0,20	0,03	29,1	25.2.1964
Cystoseira myriophylloides	1,21	0,19	1,02	15	0,08	0,15	17,3	21.4.1964

Les différentes fractions azotées sont exprimées en pourcentages du poids sec à 105° C.

Nt = azote total ; Ns = azote soluble ; Np = azote insoluble ; NNO_3 = azote nitrique ; NNO_2 = azote nitreux ; NNH_3 = azote ammoniacal.

TABLEAU VI

Valeurs de différentes fractions azotées des RHODOPHYCEES

	Nt	Ns	Np	Ns % de Nt	NNO_3	NNO_2 x 10^3	NNH_3 x 10^3	Date de récolte		Nt	Ns	Np	Ns % de Nt	NNO_3	NNO_2 x 10^3	NNH_3 x 10^3	Date de récolte
Porphyra umbilicalis	6,89	1,86	5,03	27	0,70	0,78	43,2	17.01.1964	*Ceramium flabelligerum*	4,32	0,85	3,47	19	0,04	0,41	21,8	24.10.1968
Gelidium latifolium	2,55	0,72	1,83	22	0,06	0,34	25,9	02.07.1968	*Ceramium rubrum*	4,73	1,17	3,56	24	0,53	0,64	29,1	14.03.1964
Dumontia incrassata	4,92	1,38	3,54	28	0,28	0,41	28,9	30.01.1964	*Bornetia secundiflora*	1,68	0,44	1,24	26	0,07	0,08	18,8	13.09.1968
Dilsea carnosa	5,71	1,47	4,24	26	0,41	0,07	40,5	16.04.1964	*Griffithsia flosculosa*	4,00	1,28	2,72	32	0,60	2,77	82,3	28.02.1964
Corallina squamata	1,95	0,82	1,13	42	0,12	0,10	25,3	14.03.1964	*Delesseria sanguinea*	3,25	1,24	2,01	38	0,38	0,02	71,1	16.04.1964
Grateloupia filicina	2,88	0,38	2,50	13	0,02	0,17	35,9	13.09.1968	*Cryptopleura ramosa*	4,08	1,28	2,80	31	0,15	0,17	24,6	24.10.1968
Furcellaria fastigiata	4,48	1,70	2,78	38	0,63	0,60	59,1	30.01.1964	*Polysiphonia elongata*	4,45	1,12	3,33	25	0,58	0,04	22,7	14.03.1964
Cystoclonium purpureum	3,55	0,93	2,62	27	0,11	0,19	25,7	24.10.1968	*Polysiphonia lanosa*	5,62	2,23	4,39	39	0,21	0,76	28,3	24.01.1966
Calliblepharis ciliata	4,79	1,33	3,46	27	0,42	0,37	34,1	17.01.1964	*Polysiphonia nigressens*	4,79	0,92	3,87	19	0,25	0,03	15,5	28.03.1964
Plocamium coccineum	4,43	1,27	3,16	28	0,53	0,52	19,3	30.01.1964	*Laurencia obtusa*	3,76	2,10	1,66	55	0,23	0,34	19,8	24.10.1968
Sphaerococcus coronopifolius	4,48	1,40	3,08	31	0,66	0,54	27,4	30.01.1964	*Laurencia hybrida*	4,90	1,63	3,27	33	0,36	0,88	29,5	28.02.1964
Gracilaria verrucosa	4,27	1,48	2,79	35	0,36	1,02	31,0	14.03.1964	*Laurencia pinnatifida*	4,47	1,12	3,35	25	0,32	0,17	38,9	17.01.1964
Gymmogongrus griffithsiae	4,59	1,34	3,25	29	0,14	0,37	23,3	02.07.1968									
Ahnfeltia plicata	4,16	0,83	3,33	19	0,27	0,51	32,8	17.01.1964									
Chondrus crispus	4,30	1,49	2,81	34	0,15	0,12	30,2	17.01.1964									
Gigartina acicularis	2,32	0,43	1,89	18	0,09	0,14	28,9	13.09.1968									
Gigartina stellata	3,39	1,13	2,26	33	0,19	0,11	27,3	30.01.1964									
Gigartina pistillata	3,99	0,85	3,14	21	0,02	0,07	24,7	14.02.1965									
Gigartina teedii	3,78	1,33	2,45	35	0,11	0,16	31,3	24.10.1968									
Rhodymenia palmata	4,68	1,09	3,35	23	0,60	0,18	35,4	30.01.1964									
Lomentaria articulata	3,82	1,23	2,59	32	0,63	0,63	30,7	16.02.1964									
Lomentaria clavellosa	3,08	1,34	1,65	46	0,24	0,19	36,1	24.10.1968									
Chylocladia verticillata	3,38	0,85	2,53	25	0,47	2,81	43,6	14.03.1964									
Chylocladia squarrosa	3,85	0,97	2,88	25	0,59	0,48	35,4	14.03.1964									
Gastroclonium ovatum	3,91	1,16	2,75	29	0,49	0,79	38,2	14.03.1964									

Les différences fractions azotées sont exprimées en pourcentages du poids sec à 105°C.

Nt = azote total ; Ns = azote soluble ; Np = azote insoluble ; NNO_3 = azote nitrique ; NNO_2 = azote nitreux ; NNH_3 = azote ammoniacal.

En ce qui concerne les Algues des côtes bretonnes, chez les Chlorophycées les pourcentages de l'azote total sont élevés (de 4 à 5 °/₀) pour la plupart des espèces, sauf pour *Monostroma grevillei* (1,05 °/₀) et *Codium bursa* (1,2 °/₀) (Tableau IV et Fig. 5).

Chez les Phéophycées, les valeurs de cette fraction azotée sont assez faibles pour l'ensemble des espèces (moyenne : 2,8 °/₀). Les plus fortes d'entre elles atteignent 4 °/₀ environ (*Petalonia fascia, Laminaria saccharina, Fucus ceranoides*). Les Scytosiphonacées, Laminariacées et les *Fucus* (*F. muscoides* excepté) présentent les taux les plus importants, et les Cystoseiracées les plus bas. Mais la valeur minimum a été obtenue pour une Laminariale, *Chorda filum* (1,0 °/₀) (Tableau V, Fig. 5).

Chez les Rhodophycées, les pourcentages de la fraction azotée totale sont élevés (moyenne : 4,1 °/₀) et assez homogènes dans leur ensemble. Les chiffres les plus remarquables concernent *Porphyra umbilicalis* (6,9 °/₀), *Dilsea carnosa* (5,7 °/₀) et *Polysiphona lanosa* (5,6 °/₀) d'une part, *Bornetia secundiflora* (1,7 °/₀) et *Corallina squamata* (1,95 °/₀) d'autre part. Les céramiales et les Gigartinales sont les ordres les plus riches en azote total, les Rhodyméniales le sont un peu moins (Tableau VI, Fig. 6).

Pour l'azote total comme pour les autres fractions azotées, il est difficile de comparer les résultats de ce travail à ceux que d'autres auteurs ont publié. Les dates de prélèvement, les méthodes utilisées, en particulier le mode de stabilisation, sont différentes, et les caractères des échantillons sont, le plus souvent, complètement inconnus. En ce qui concerne l'azote total, si les valeurs observées dans le présent travail sont généralement supérieures à celles qui sont données par d'autres chercheurs, elles varient entre des extrêmes semblables : 1 °/₀ à 6,9 °/₀ (données personnelles), 0,64 à 7,79 °/₀ (OGINO, 1955), 0,77 à 6,56 °/₀ (PELLEGRINI, 1968). Pour certaines espèces, les pourcentages peuvent être comparés. Ainsi, pour *Porphyra tenera,* OGINO a obtenu des taux de 6,19 à 6,66 °/₀ (janvier 1950-1951), et *P. umbilicalis* en Bretagne atteint 6,89 °/₀ . *Ceramium rubrum* analysé par PELLEGRINI (juillet 1965) et sur les côtes bretonnes (mars 1964) présentait des valeurs très voisines : 4,76 et 4,73 °/₀ respectivement. En Angleterre, ROSS (1953) a signalé des valeurs de 1,5 °/₀ pour *Corallina officinalis* (1,9 °/₀ pour *C. squamata* en Bretagne) et 4,8 °/₀ pour *Polysiphonia lanosa* (5,6 °/₀ dans cette étude).

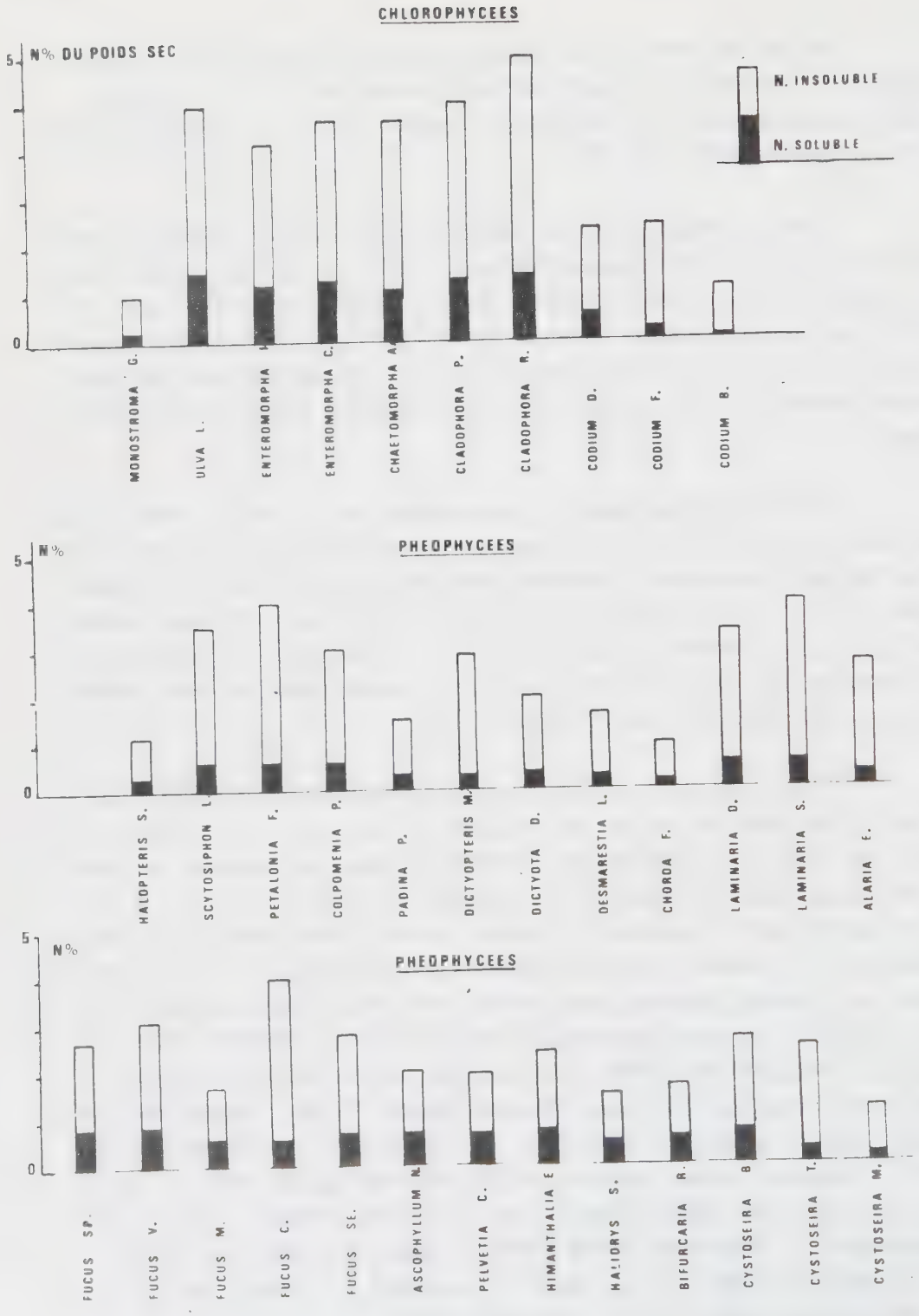


Fig. 5.- La composition azotée des Chlorophycées et des Phéophycées. La colonne entière représente la fraction azotée totale, en pourcentage du poids sec.

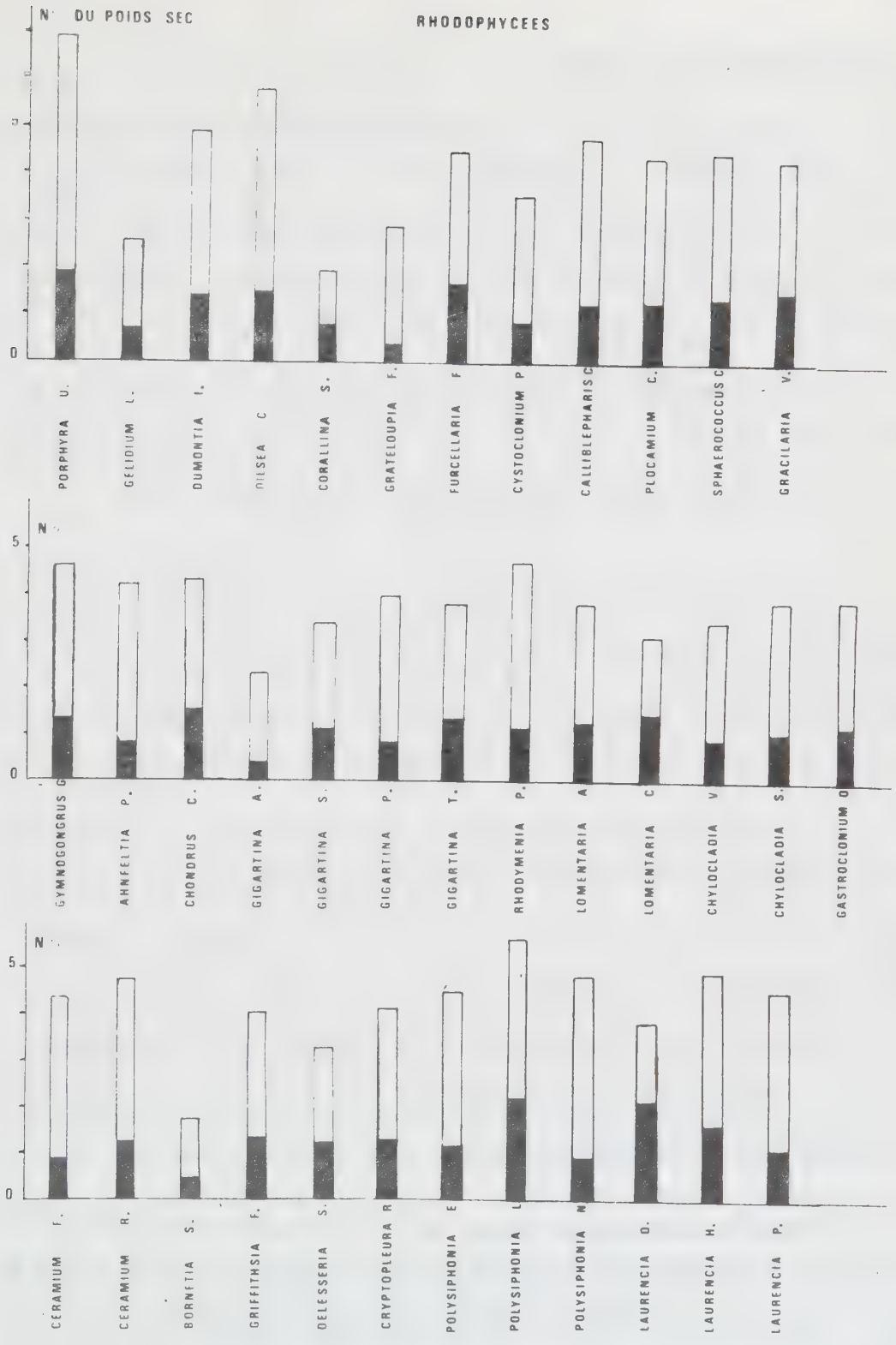


Fig. 6.- La composition azotée des Rhodophycées. (Même représentation que pour la Fig. 5).

2.- La fraction azotée soluble

La concentration des composés azotés solubles dans la poudre végétale peut être exprimée en pourcentage du poids sec. Mais il apparaît plus important sur le plan physiologique d'exprimer en pourcentage de l'azote total leur proportion relative par rapport aux substances insolubles. En outre, la comparaison des valeurs de ce dernier pourcentage d'une espèce à l'autre est plus significative. Ce sont donc ces valeurs qui seront comparées ici.

Les conclusions des travaux qui se rapportent à la composition azotée des Algues marines s'accordent sur la prédominance de la fraction insoluble. Les constituants solubles représentent environ 10 à 40 °/₀ de la valeur de l'azote total (SCHMID, 1959 ; FOWDEN, 1962 ; PELLEGRINI, 1968).

Chez les Algues des côtes bretonnes, les Chlorophycées possèdent une fraction azotée soluble dont les pourcentages sont assez proches d'une Algue à l'autre. Pour sept espèces sur 10, les variations sont comprises entre 24 et 26 °/₀. *Codium fragile* et *C. bursa* se distinguent par leur faible valeur : 12 °/₀ . Il en résulte que les composés insolubles, les protéines en particulier, forment la plus grande partie des constituants azotés des Algues vertes étudiées : 74 à 88 °/₀ .

Les Phéophycées comprennent un représentant dont le pourcentage d'azote soluble est le plus faible de l'ensemble des Algues étudiées : *Dictyopteris membranacea* (9 °/₀). La valeur la plus élevée a été enregistrée pour *Halidrys siliquosa* (38 °/₀). Les Laminariales n'ont toutes qu'une proportion réduite de leur fraction azotée totale sous forme soluble (13 à 17 °/₀). Mais cette proportion est nettement supérieure chez les Fucales (voisine ou plus grande que 30 °/₀), sauf pour *Fucus ceranoides* (14 °/₀) et *Cystoseira myriophylloides* (15 °/₀). La valeur moyenne des pourcentages se situe à 23,6 °/₀ . Dans cette classe comme dans la précédente, la majorité des composés azotés se présente donc encore sous forme insoluble : 62 à 91 °/₀ .

Les Rhodophycées ont fourni les plus forts pourcentages d'azote soluble de tous les échantillons analysés : *Corallina squamata* : 42 °/₀ , *Lomentaria clavellosa* : 46 °/₀ , *Laurencia obtusa* : 55 °/₀ . La plus faible valeur a été observée chez *Grateloupia filicina* : 13 °/₀ . Dans leur ensemble les résultats sont très homogènes, la plupart des chiffres étant voisins de 30 °/₀ .

La proportion relative des composés azotés solubles et insolubles des Algues des côtes bretonnes est donc, en moyenne, du même ordre de grandeur que celles signalées par d'autres chercheurs. Les pourcentages extrêmes, peuvent de même, être comparés. Ainsi, pour les valeurs les plus faibles, OGINO (1955) détermine 5,7 °/₀ d'azote soluble dans la fraction azotée totale de *Grateloupia elliptica* et PELLIGRINI (1968), 8,57 °/₀ dans celle de *Nemalion helminthoïdes.* Chez *Dictyopteris membranacea* analysée dans ce travail, le pourcentage correspondant est de 9 °/₀. En ce qui concerne les plus fortes valeurs, celles que PELLEGRINI (1968) a obtenues : 41,84 °/₀ chez *Gracilaria verrucosa* et 48,21 °/₀ chez *Gigartina acicularis,* se rapprochent des maximums observés chez les Algues de Bretagne : 42 °/₀ chez *Corallina squamata,* 46 °/₀ chez *Lomentaria clavellosa* et 55 °/₀ chez *Laurencia obtusa.*

3.- L'azote minéral

a. - L'azote ammoniacal

D'après HAAS et HILL (1933) il existerait "beaucoup" d'azote ammoniacal chez *Laminaria digitata,* en janvier, et chez *Fucus vesiculosus,* en avril. CHANNING et YOUNG (1953) signalent, pour six espèces, des pourcentages de cette fraction azotée qui vont de 0,01 à 0,07 °/₀ du poids sec, à différentes périodes de l'année. JONES (1956) donne, pour *Himanthalia elongata,* des valeurs de "base azotée volatile" (azote ammoniacal essentiellement) comprises entre 0,020 et 0,063 °/₀ du poids sec.

Chez les Algues des côtes de Bretagne, l'azote ammoniacal est l'une des fractions azotées dont les concentrations sont les plus faibles. Pour les Chlorophycées, elles se situent entre 6,6 microgrammes pour 100 mg de poids sec chez *Monostroma grevillei,* et 59 microgrammes chez *Codium fragile.* Les valeurs moyennes sont de 30 microgrammes environ. Chez les Phéophycées, les pourcentages obtenus sont peu élevés : de 12,9 à 38 microgrammes (chez *Bifurcaria rotunda* et *Padina pavonia* respectivement), avec une moyenne de 20 microgrammes environ. Pour les Rhodophycées, cette moyenne est de l'ordre de 30 microgrammes. *Delesseria sanguinea* (71,1 µg) et *Griffithsia flosculosa* (82,3 µg) sont les seules espèces dont les concentrations sont nettement plus fortes.

La fraction azotée ammoniacale des Algues marines des côtes de Bretagne ne se distingue donc pas de celles d'Algues marines d'autres régions du

globe. Les pourcentages obtenus au cours de cette étude, compris entre 0,007 et 0,082 °/₀ , avec une moyenne de 0,03 °/₀ environ, sont du même ordre de grandeur que ceux qui sont publiés dans la littérature scientifique.

b. - L'azote nitreux

Au cours d'un travail sur *Laminaria saccharina, L. hyperborea, Alaria esculenta, Ascophyllum nodosum, Fucus serratus* et *F. vesiculosus,* LARSEN et JENSEN (1957) n'ont pu doser cette forme d'azote dans leurs échantillons, les concentrations étant inférieures à 0,001 °/₀ du poids sec.

Chez les Algues bretonnes, l'azote nitreux est, avec l'azote ammoniacal, la fraction azotée la moins représentée chez les espèces examinées. Chez les Chlorophycées, les teneurs sont très faibles, inférieures à 1 microgramme pour 100 mg de poids sec, soit 0,001 °/₀ (Tableau IV), sauf chez *Ulva lactuca* (2,16 µg) et *Chaetomorpha aerea* (2,00 µg). Des chiffres analogues sont relevés chez les Phéophycées et les Rhodophycées (Tableau V et VI), *Griffithsia flosculosa* (2,77 µg) et *Chylocladia verticillata* (2,81 µg) étant les deux Algues les mieux pourvues en nitrites.

Les résultats du présent travail confirment donc les données de LARSEN et JENSEN (1957) et permettent de les généraliser pour un nombre plus important d'échantillons. Les Algues marines ne présentent qu'exceptionnellement des concentrations de nitrites supérieures à 0,001 °/₀ . Les rares valeurs qui dépassent ce pourcentage n'atteignent, chez les espèces étudiées, toutefois jamais 0,003 °/₀.

c. - L'azote nitrique

Comme pour l'azote ammoniacal et nitreux, il n'existe que très peu de renseignements qui se rapportent à la présence et aux concentrations de l'azote nitrique chez les Algues marines. CHANNING et YOUNG (1953) ont publié des valeurs comprises entre 0,01 et 0,86 °/₀ du poids sec, pour six espèces. LARSEN et JENSEN (1957), en même temps que les nitrites, ont recherché les nitrates dans les échantillons d'Algues brunes citées plus haut. Ils signalent des pourcentages inférieurs à 0,1 °/₀ pendant les différents mois de l'année, sauf au printemps, période pendant laquelle ils atteignent des taux dix

fois plus importants, particulièrement chez les Laminaires. Ainsi, la fronde de *Laminaria saccharina* peut contenir jusqu'à 1 °/₀ de nitrates au mois de mars. D'après ces auteurs, les fortes concentrations enregistrées au printemps coïncident avec une teneur plus élevée en nitrates dans l'eau de mer pendant cette saison.

Chez les Algues marines des côtes bretonnes, l'azote minéral est surtout représenté par des nitrates. Les valeurs obtenues pour les Chlorophycées sont relativement élevées, voisines de 0,3 °/₀ du poids sec. Les plus fortes d'entre elles se rapportent à *Ulva lactuca* (0,45 °/₀), *Chaetomorpha aerea* (0,51 °/₀) et *Cladophora pellucida* (0,55 °/₀), et la plus faible à *Codium bursa* (0,06 °/₀).

Chez les Phéophycées, les pourcentages, le plus souvent compris entre 0,1 et 0,2 °/₀ , sont inférieurs à 0,1 °/₀ chez huit espèces, et atteignent un maximum de 0,37 °/₀ chez *Fucus serratus.*

Une étude particulière entreprise sur *Laminaria flexicaulis* (Fig. 3), a montré une inégale répartition de l'azote nitrique dans les différentes parties de l'appareil végétatif. Le stipe et les crampons présentent les pourcentages les plus importants. Mais les nitrates se répartissent d'une façon sensiblement uniforme dans la fronde.

Chez les Rhodophycées, certains échantillons possèdent des teneurs assez fortes d'azote nitrique : *Porphyra umbilicalis* (0,70 °/₀), *Furcellaria fastigiata* (0,63 °/₀), *Sphaerococcus coronopifolius* (0,66 °/₀), *Rhodymenia palmata* (0,60 °/₀), *Lomentaria articulata* (0,63 °/₀), *Chylocladia squarrosa* (0,59 °/₀), *Griffithsia flosculosa* (0,60 °/₀), *Polysiphonia elongata* (0,58 °/₀). Les Gigartinacées présentent des valeurs relativement faibles : 0,02 à 0,19 °/₀ , et les Rhodyméniales des concentrations élevées, voisines de 0,50 °/₀ pour toutes les espèces, sauf une. Pour les Céramiales, les pourcentages sont moyens (0,25 à 0,30 °/₀) ou forts (0,50 à 0,60 °/₀) sauf pour *Ceramium flabelligerum* (0,04 °/₀) et *Bornetia secundiflora* (0,07 °/₀).

Chez les espèces analysées dans ce travail, les nitrates présentent donc également des concentrations équivalentes à celles signalées par ailleurs. **La composition en constituants azotés minéraux d'Algues marines d'origines diverses semble donc assez homogène. Mais, dans le détail, des particularités marquent certaines espèces.**

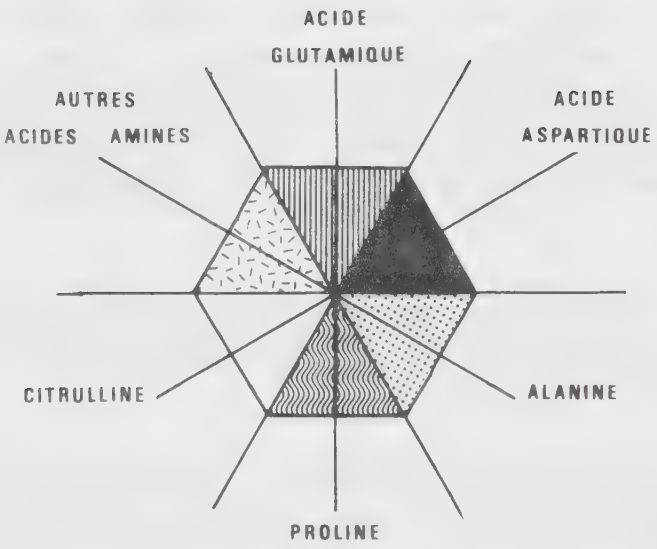


Fig. 7.- Représentation graphique utilisée pour visualiser les proportions des constituants prépondérants de la composition en acides aminés libres des Algues marines étudiées.

La représentation en étoile (KUFFERATH, 1951) permet de traduire la proportion relative des six acides aminés quantitativement les plus importants de la fraction azotée soluble. La surface de l'étoile entière correspond à la somme des acides aminés libres (100 %). La surface figurée pour chaque aminoacide est directement proportionnelle à son pourcentage, exprimé par rapport à la quantité totale (en µM) des acides aminés libres dans l'échantillon. Les cinq acides aminés le plus fréquemment rencontrés en proportions importantes dans la fraction aminée libre sont représentés sur l'étoile. La sixième branche du graphique correspond à la somme des autres acides aminés libres.

4. - La fraction aminée libre

Les résultats des analyses les plus récentes permettent d'établir la liste des acides aminés présents dans la fraction azotée soluble des Algues marines. Certains d'entre eux ont une répartition très large et sont cités dans pratiquement tous les travaux : l'alpha-alanine, la glycine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la lysine, l'histidine, l'arginine, l'ornithine, la citrulline, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine et la proline.

D'autres acides aminés ont également été signalés : la béta-alanine, les acides alpha- et gamma- aminobutyrique, l'acide 2-aminocaprilique, l'acide cystéique, la cystine, l'homocystine, la phénylsérine, l'hydroxyproline, le tryptophanne (4), les iodotyrosines (la di-iodotyrosine essentiellement : ROCHE et LAFON, 1949 ; POHLOUDEK-FALINI et KALTERBACH, 1965). Mais ces composés n'existent qu'à très faible concentration chez les Algues marines étudiées, souvent même à l'état de traces.

Des acides aminés rares, tout au moins pour ces végétaux marins, ou nouveaux ont pu être mis en évidence ou isolés chez certaines Algues : la taurine, la N-méthyl-taurine, la di-N-méthyl-taurine (LINDBERG, 1955), l'acide 1-4-thiazane-3-carboxylique-S-oxyde (KURIYAMA, 1961), l'acide D-cystéinolique (ITO, 1963), la S-hydroxyméthyl-L-homocystéine (TAKAGI et OKUMURA, 1964), la D-glycéryltaurine (ITO, 1965), la gongrine (acide gamma (guanyluréido)butyrique) et la gigartinine (acide L-alpha-amino-delta(guanyl-uréido)valérique) (ITO et coll., 1966), l'acide gamma-guanidino-butyrique (ITO et coll., 1967), l'acide domoïque (DAIGO, 1959), ces trois derniers étant des acides iminés.

L'étude des acides aminés libres des Algues marines des côtes bretonnes a été volontairement limitée aux plus courants d'entre eux. D'autres acides, plus rares et généralement présents en très faibles concentrations, existent probablement aussi chez les échantillons analysés. Mais leur mise en évidence pose des problèmes matériels particuliers. Les résultats d'une telle recherche ne présentaient pas un intérêt immédiat. Il était préférable, dans un premier temps, d'établir la composition en acides aminés quantitativement importants, composition encore très mal connue.

(4) TAKAGI, 1953 ; WAGNER, 1962 ; LEWIS et GONZALVES, 1959-1962 ; LEWIS, 1962-1965 ; AUGIER, 1965 ; NASR et coll., 1967-1968 ; LANDSBERGER et coll., 1969.

TABLEAU VII

Les acides aminés libres des CHLOROPHYCEES et PHEOPHYCEES

(en micromoles par gramme d'azote total)

	Orn.	Arg.	Cit.	Lys.	His.	Pro.	Asp.	Glu.	Ala.	Gly.	Thr.	Val.	Mét.	Ileu.	Leu.	Tyr.	Phé.	Sér.	Amides
Monostroma grevillei	-	57,1	-	28,6	47,6	-	190,4	581,7	447,4	152,3	171,4	199,9	28,6	57,1	57,1	9,5	19,0	57,1	247,5
Ulva lactuca	-	146,0	-	40,0	48,0	392,0	238,0	450,0	182,0	98,0	74,0	24,0	16,0	18,0	32,0	14,0	26,6	147,1	836,9
Enteromorpha intestinalis	+	73,8	-	2,4	57,1	2,4	264,2	635,5	859,2	107,1	42,8	49,9	4,7	4,8	26,2	-	7,1	126,1	1078,1
Enteromorpha compressa	1,3	36,2	-	4,3	42,6	709,3	138,4	451,6	121,4	51,1	12,8	8,5	+	6,4	6,4	2,1	2,1	124,6	
Chaetomorpha aerea	+	+	-	1185,1	339,2	220,5	273,5	515,2	485,5	44,5	+	186,6	38,8	29,7	44,5	+	44,5	137,7	1260,6
Cladophora pellucida	7,8	39,2	-	41,2	37,2	197,0	578,2	531,9	462,9	111,7	35,3	54,9	29,4	31,4	50,9	25,5	29,4	112,4	936,9
Cladophora rupestris	+	-	-	619,6	150,3	626,2	110,2	220,4	98,5	35,1	+	+	+	+	+	+	+	60,6	2071,7
Codium dichotomum	-	-	-	-	+	-	330,4	1598,3	731,0	82,6	86,7	49,5	12,4	37,2	57,8	12,4	45,4	49,7	152,8
Codium fragile	76,0	+	-	56,0	+	-	432,0	1028,0	196,0	84,0	+	+	-	28,0	44,0	+	+	84,0	376,0
Codium bursa	-	+	-	+	+	-	+	498,4	878,1	113,8	+	+	+	+	+	+	+	195,1	
Halopteris scoparia	35,1	192,9	-	70,2	-	-	420,9	631,4	869,5	491,1	105,2	149,1	+	+	+	+	+	131,6	429,7
Scytosiphon lomentaria	88,7	237,4	-	+	128,7	-	674,9	443,3	2482,5	80,1	128,7	100,1	108,7	60,1	68,6	+	+	102,9	394,2
Petalonia fascia	+	52,1	-	17,4	41,9	+	386,9	275,3	1247,8	27,3	64,5	42,2	25,6	17,6	22,3	+	+	62,0	104,2
Colpomenia peregrina	13,5	121,3	-	47,2	53,9	+	175,2	377,4	808,8	8,1	37,1	47,7	8,3	43,8	43,8	13,4	25,3	97,7	
Padina pavonia	-	+	-	+	+	-	1116,9	525,6	1714,8	183,9	+	111,7	913,2	+	+	+	+	223,4	413,9
Dictyopteris membranacea	10,3	+	-	10,3	37,8	-	368,1	134,2	223,6	168,6	113,2	27,5	+	+	+	+	37,6	323,4	526,3
Dictyota dichotoma	99,6	49,9	-	119,8	40,0	-	468,9	1650,0	509,7	145,0	179,5	80,8	64,8	49,7	39,3	25,0	50,3	305,1	1598,3
Desmarestia ligulata	-	163,6	-	+	+	-	569,6	418,1	1957,4	127,3	66,7	+	+	+	+	+	+	254,5	187,8
Chorda filum	50,0	260,0	-	60,0	-	420,0	550,0	430,0	1610,0	80,0	140,0	60,0	40,0	42,0	30,0	-	-	270,0	580,0
Laminaria digitata	-	105,8	-	8,8	64,7	123,5	249,9	617,4	2670,7	67,6	61,7	20,6	20,6	2,9	11,7	2,9	17,6	224,2	
Laminaria saccharina	-	87,5	-	12,5	5,0	425,0	17,5	442,5	1675,0	7,5	102,5	37,5	17,5	15,0	22,5	+	30,0	202,4	
Alaria esculenta	-	211,5	-	70,5	29,7	+	745,7	912,7	2448,6	100,2	92,7	107,6	51,9	18,5	33,4	18,5	51,7	133,6	218,9

Le signe + indique la présence de l'acide aminé en quantités non dosables

Le signe - indique l'absence de l'acide aminé

TABLEAU VIII

Les acides aminés libres des PHEOPHYCEES et RHODOPHYCEES

(en micromoles par gramme d'azote total)

	Orn.	Arg.	Cit.	Lys.	His.	Pro.	Asp.	Glu.	Ala.	Gly.	Thr.	Val.	Mét.	Ileu	Leu.	Tyr.	Phé.	Sér.	Amides
Fucus spiralis	-	136,9	-	14,7	7,4	-	266,4	1317,2	506,9	14,6	22,2	85,1	25,9	25,7	25,7	14,7	48,1	76,7	
Fucus vesiculosus	-	76,8	-	6,4	16,0	96,0	128,0	716,8	659,2	51,2	38,4	22,4	32,0	22,4	19,2	32,2	38,5	198,7	
Fucus muscoides	-	139,4	-	87,1	+	-	581,0	1452,5	1243,3	108,8	151,1	87,0	86,8	17,4	23,2	+	75,5	284,7	633,3
Fucus ceranoides	+	119,0	-	+	86,8	+	525,7	381,9	479,1	27,3	27,2	26,9	+	+	+	+	52,1	141,6	773,7
Fucus serratus	7,2	10,7	-	14,3	24,9	+	7,3	1253,1	756,8	57,1	57,1	24,9	14,2	24,8	24,8	+	49,6	191,4	319,1
Ascophyllum nodosum	4,9	4,8	-	19,7	14,7	+	211,6	718,3	924,9	39,4	841,3	68,9	24,6	19,7	19,9	11,8	39,6	211,8	463,0
Pelvetia canaliculata	-	96,9	-	+	96,9	-	8,2	1009,8	550,8	50,8	30,6	91,8	16,8	10,2	12,2	-	20,4	219,3	
Himanthalia elongata	8,3	108,4	-	37,5	104,2	-	308,6	1934,9	1847,3	183,5	70,9	104,4	8,2	33,4	37,4	53,9	66,7	233,5	1003,6
Halidrys siliquosa	+	3,9	-	13,0	8,4	+	130,0	1592,5	97,5	78,0	32,5	+	8,4	13,0	16,8	3,9	16,8	88,5	
Bifurcaria rotunda	35,4	43,7	-	36,4	41,3	-	11,8	1144,6	1427,8	53,1	41,3	53,3	19,5	43,7	53,2	4,7	19,4	203,5	
Cystoseira baccata	-	33,3	-	45,5	16,3	+	133,2	569,8	680,8	36,8	51,8	50,7	33,3	14,8	27,7	11,1	22,3	93,2	574,0
Cystoseira tamariscifolia	+	24,0	-	16,0	8,0	-	292,0	704,0	456,0	88,0	84,0	44,0	12,0	8,0	8,0	+	20,0	122,5	616,6
Cystoseira myriophylloides	16,7	91,6	-	116,6	41,6	-	374,8	816,3	1099,6	149,9	91,8	91,2	+	+	58,3	33,4	116,8	316,5	
Porphyra umbilicalis	2,9	27,5	-	19,3	3,5	+	63,8	271,2	1458,7	63,5	27,3	19,3	23,2	8,7	59,4	2,8	4,8	72,5	
Gelidium latifolium	66,6	86,2	-	50,9	101,9	-	286,2	2281,4	591,9	239,1	101,7	66,5	+	50,9	+	86,3	51,0	337,2	
Dumontia incrassata	14,3	22,4	-	18,4	42,8	55,1	75,5	373,3	344,7	142,8	44,9	53,1	10,2	36,7	22,4	8,2	14,8	69,4	
Dilsea carnosa	+	178,5	610,7	1044,7	99,7	-	624,7	631,7	337,7	21,0	21,2	21,1	+	+	+	-	28,0	331,0	57,7
Corallina squamata	-	46,1	122,9	92,2	61,4	+	123,2	527,4	291,7	123,4	97,3	35,7	61,4	92,2	92,8	20,5	52,3	189,4	465,9
Grateloupia filicina	+	+	613,9	+	65,2	-	85,7	1426,9	246,9	109,7	24,1	174,9	+	+	+	+	+	138,8	
Furcellaria fastigiata	-	+	683,6	+	189,6	+	104,8	497,3	153,9	93,7	20,1	31,2	+	+	+	-	198,5	37,9	
Cystoclonium purpureum	118,0	+	843,0	146,1	+	+	286,6	637,9	146,7	44,9	64,6	28,1	36,5	59,0	+	+	+	233,2	
Calliblepharis ciliata	+	22,9	-	37,4	27,0	563,7	230,9	1146,1	162,2	20,6	24,9	+	-	-	91,5	-	14,6	97,7	
Plocamium coccineum	22,6	185,3	-	15,8	61,1	-	219,2	1281,4	2687,1	239,6	83,6	67,8	+	42,9	34,2	-	34,6	246,3	
Sphaerococcus coronopifolius	13,4	78,1	-	15,6	29,0	-	274,3	3113,1	165,0	110,4	51,3	24,5	44,6	60,2	60,8	+	+	98,1	
Gracilaria verrucosa	117,0	1387,6	1730,9	196,3	620,1	+	308,9	928,9	189,9	51,5	51,7	11,7	+	+	+	+	+	250,6	

Le signe + indique la présence de l'acide aminé en quantités non dosables

Le signe - indique l'absence de l'acide aminé

TABLEAU IX

Les acides aminés libres des RHODOPHYCEES
(en micromoles par gramme d'azote total)

	Orn.	Arg.	Cit.	Lys.	His.	Pro.	Asp.	Glu.	Ala.	Gly.	Thr.	Val.	Mét.	Ileu	Leu.	Tyr.	Phé	Sér.	Amides
Gymnogongrus griffithsiae	19,6	161,3	1153,2	34,9	69,8	+	346,6	564,6	194,0	109,0	21,8	130,8	194,8	54,5	104,6	109,4	50,1	67,5	202,6
Ahnfeltia plicata	52,8	216,0	396,0	19,2	600,0	+	69,6	110,4	319,2	141,6	+	14,4	76,8	16,8	28,8	+	96,0	146,4	
Chondrus crispus	18,6	25,7	457,0	25,5	74,2	-	6,9	368,9	64,9	71,9	16,2	6,9	6,7	9,3	9,1	-	127,6	41,7	
Gigartina acicularis	68,9	+	620,6	181,1	81,9	-	344,8	1577,5	465,5	163,8	112,1	+	+	206,9	+	67,9	+	306,0	
Gigartina stellata	8,8	61,9	1351,1	11,8	17,7	-	73,7	405,8	153,4	144,6	20,6	+	+	+	+	+	123,6	129,8	
Gigartina pistillata	12,5	67,5	-	35,0	22,5	-	8,3	547,5	52,5	47,5	24,9	11,0	5,5	2,8	5,6	5,6	152,5	112,5	
Gigartina teedii	14,3	128,5	47,6	33,3	80,9	+	295,1	3536,7	994,8	276,1	114,2	147,6	114,2	94,6	47,3	33,3	65,9	134,2	468,4
Rhodymenia palmata	4,4	-	-	2,2	4,3	2204,6	696,5	747,6	313,1	46,8	23,4	38,3	+	+	38,3	-	-	+	
Lomentaria articulata	+	+	-	15,7	+	-	403,5	717,9	170,3	128,4	18,4	+	+	+	+	-	+	94,3	83,4
Lomentaria clavellosa	122,4	-	189,9	148,1	25,7	+	196,4	1101,2	640,8	115,9	83,7	84,1	-	+	-	+	+	38,7	693,5
Chylocladia verticillata	23,1	30,7	122,9	57,6	30,7	+	335,5	672,0	591,4	276,5	-	176,6	53,5	69,1	84,5	-	-	53,7	
Chylocladia squarrosa	+	18,1	+	28,4	7,7	+	7,9	492,8	265,7	178,1	-	85,1	-	43,9	28,4	-	-	69,7	
Gastroclonium ovatum	-	+	181,8	17,9	20,5	-	401,9	191,1	657,9	145,9	+	202,2	924,2	71,7	56,3	+	15,4	92,2	217,6
Ceramium flabelligerum	+	+	-	69,3	53,1	1187,3	667,6	438,9	281,8	122,4	78,5	33,6	78,5	-	-	62,4	33,6	46,3	386,9
Ceramium rubrum	8,5	19,6	97,1	25,3	12,7	495,8	44,3	354,5	179,4	78,1	27,4	-	-	-	-	+	+	65,4	113,9
Bornetia secundiflora	+	+	188,8	+	+	-	23,0	843,7	495,6	230,1	+	190,2	+	+	+	+	+	125,0	648,8
Griffithsia flosculosa	25,2	37,5	-	24,8	62,5	+	82,5	1137,5	687,5	112,5	107,5	232,5	74,6	140,0	234,1	32,5	124,8	372,5	250,0
Delesseria sanguinea	+	34,5	-	70,6	113,6	3162,2	356,1	948,6	325,4	141,2	36,8	70,6	+	+	-	+	+	82,9	159,6
Cryptopleura ramosa	63,7	+	-	169,0	+	1507,6	231,6	269,5	284,2	269,5	174,3	-	+	+	+	+	+	227,0	114,6
Polysiphonia elongata	+	33,6	185,9	13,4	+	1545,6	+	627,2	651,8	96,3	-	40,3	-	13,4	+	-	26,8	92,1	537,0
Polysiphonia lanosa	+	80,1	4872,8	108,6	31,9	1364,6	290,2	372,0	105,0	92,6	+	39,2	+	26,7	26,5	14,2	185,1	92,5	250,0
Polysiphonia nigrescens	+	27,3	-	39,9	6,5	2895,9	766,5	426,3	562,8	98,7	52,5	65,1	+	65,3	12,6	+	165,8	79,7	227,5
Laurencia obtusa	+	+	-	+	+	-	194,2	1641,2	758,1	125,1	63,8	63,5	64,1	-	+	-	-	74,5	
Laurencia hybrida	+	69,4	-	52,2	51,5	1771,8	943,1	3393,6	504,0	69,4	62,7	40,3	+	47,0	47,1	+	24,6	89,6	1263,2
Laurencia pinnatifida	-	-	-	-	82,9	1821,1	1290,2	4860,8	448,0	118,7	82.7	22,4	+	60,5	+	+	+	125,2	1465,3

Le signe + indique la présence de l'acide aminé en quantités non dosables.

Le signe - indique l'absence de l'acide aminé.

a.- Les Chlorophycées

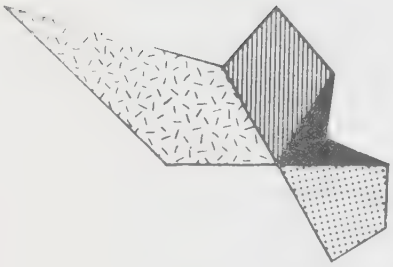
Sur les dix huit acides aminés libres et amides qui ont pu être dosés chez les 72 espèces étudiées, dix sept d'entre eux ont été rencontrés chez les Chlorophycées. Le dix huitième, la citrulline, n'a jamais été détecté chez les Algues vertes analysées. Les amides étaient présentes chez toutes, parfois même en concentrations importantes (Tableau VII ; Fig. 8 et 9).

Parmi les acides aminés basiques, l'histidine est généralement bien représentée, sauf chez les *Codium.* La présence de la lysine est constante, sauf chez *Codium dichotomum.* Ses concentrations, habituellement réduites, peuvent devenir importantes (*Chaetomorpha aerea* et *Cladophora rupestris*). L'arginine n'a pu être mise en évidence chez *Cladophora rupestris* ni chez *Codium dichotomum.* Cet acide n'existe bien souvent qu'en faibles ou même en très faibles quantités (*Chaetomorpha aerea, Codium fragile, C. bursa*). L'ornithine est absente dans les échantillons de *Monostroma grevillei, Ulva lactuca, Codium dichotomum, C. bursa,* et présente à l'état de traces (*Enteromorpha intestinalis, Chaetomorpha aerea, Cladophora rupestris*) ou en faibles concentrations chez les autres Algues vertes.

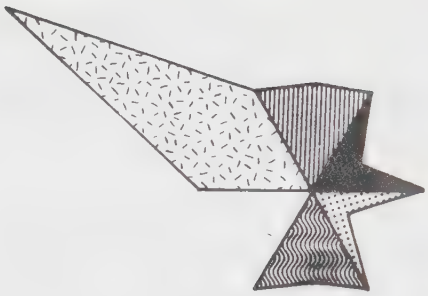
Les acides aminés dicarboxyliques et leurs amides sont toujours présents dans la fraction aminée libre des Chlorophycées, dont ils constituent souvent les éléments prépondérants. Seul *Codium bursa* ne possède que des traces d'acide aspartique.

Parmi les autres acides aminés, l'alanine et la glycine occupent une place importante, par leur présence chez toutes les espèces étudiées, et leurs concentrations relativement fortes, principalement pour l'alanine. La sérine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine se retrouvent dans toutes les fractions aminées libres des Chlorophycées, parfois à l'état de traces, parfois en quantités plus importantes (c'est le cas de la valine chez *Monostroma grevillei* et *Chaetomorpha aerea* par exemple). La méthionine, dont les concentrations sont généralement faibles, manque chez *Codium fragile*. La tyrosine est habituellement très mal représentée quantitativement. Elle n'a pu être dosée chez *Enteromorpha intestinalis.* La proline occupe une position particulière. Elle peut être absente (*Monostroma grevillei* et les *Codium*) ou présente en concentrations assez fortes ou même fortes (*Enteromorpha compressa* et *Cladophora rupestris*).

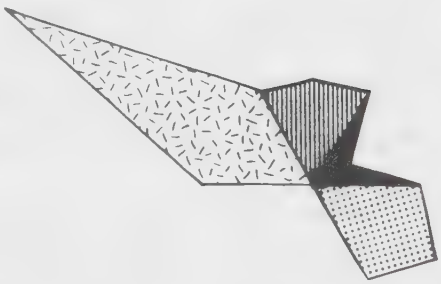
Les composés prépondérants de la fraction aminée libre des Chlorophycées analysées sont donc les amides, l'acide glutamique et l'alanine. Mais la proline et l'acide aspartique peuvent acquérir une importance non négligeable chez certaines Algues (Tableau VII ; Fig. 8 et 9).



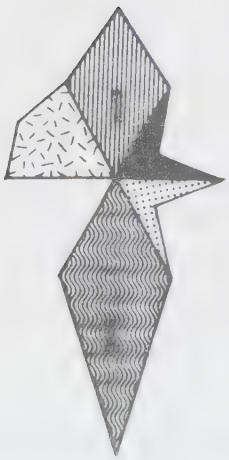
MONOSTROMA GREVILLEI



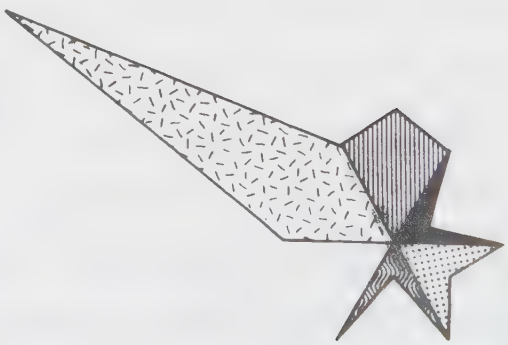
ULVA LACTUCA



ENTEROMORPHA INTESTINALIS



ENTEROMORPHA COMPRESSA



CHAETOMORPHA AEREA

Fig. 8.- Les acides aminés libres prépondérants des Chlorophycées.

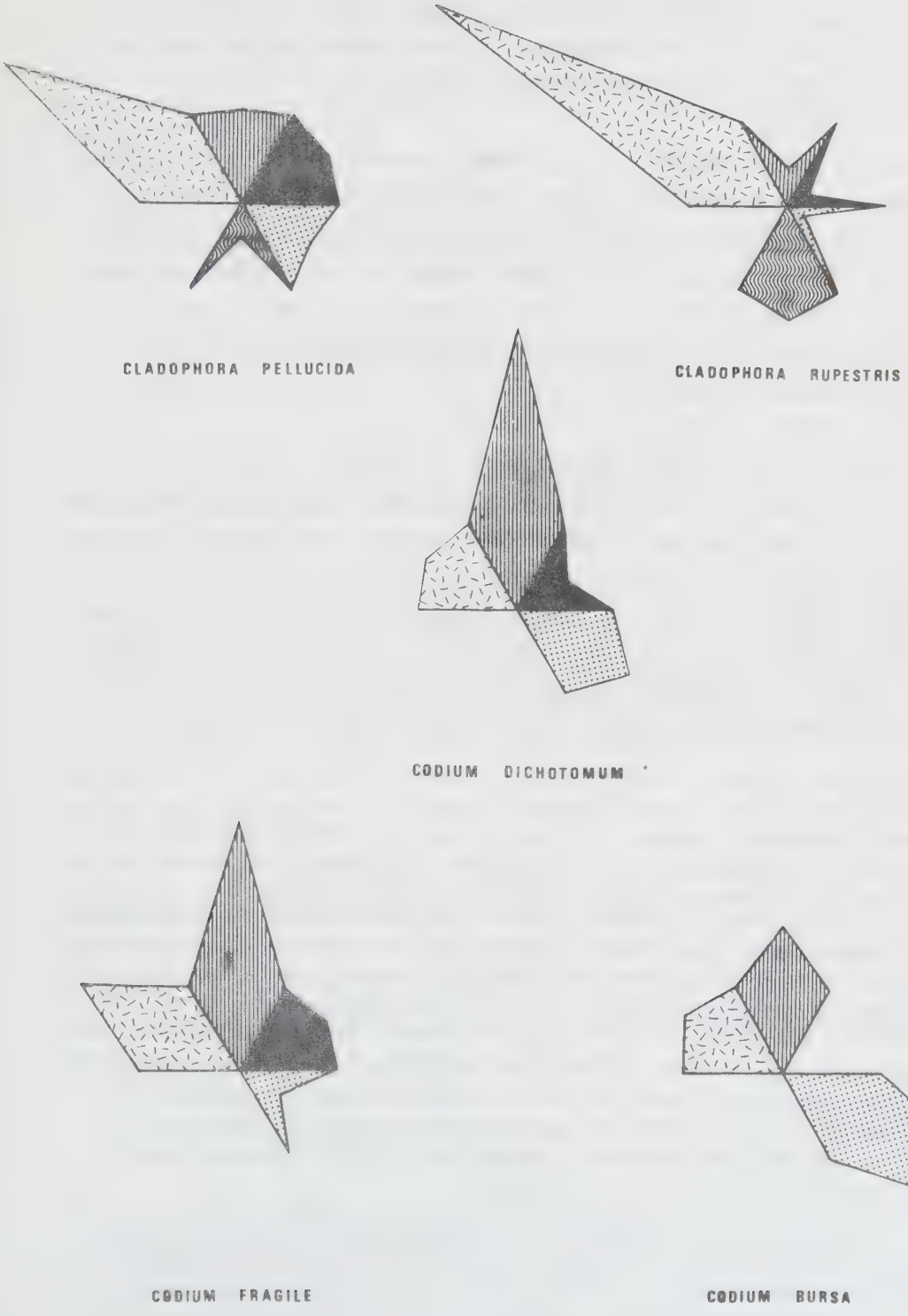


Fig. 9.- Les acides aminés libres prépondérants des Chlorophycées.

En ce qui concerne les trois ordres étudiés, la composition de chacun d'entre eux se différencie assez nettement de celles des autres, bien que celle des Ulvales ne soit pas très homogène. L'acide glutamique, les amides et la proline sont les acides aminés libres prépondérants de ce dernier ordre. Chez les Cladophorales, se sont les amides, la lysine et l'acide glutamique, et chez les Codiales, l'acide glutamique, l'alanine et l'acide aspartique.

Chaque espèce est bien individualisée. Certaines se distinguent particulièrement bien : *Enteromorpha compressa,* par le fait que la proline constitue plus de 40 % de la somme des acides aminés libres, *Chaetomorpha aerea* et *Cladophora rupestris* par la concentration assez élevée de lysine. Cette dernière Algue, ainsi que *Codium fragile* et *C. bursa,* se différencient de plus parce que plusieurs acides aminés paraissent absents ou ne sont représentés qu'à l'état de traces dans leur fraction aminée libre.

Les résultats du présent travail seront comparés aux données les plus récentes, qui sont aussi les plus fournies, de la littérature scientifique. Mais cette comparaison se fera avec des valeurs quantitatives acquises à l'aide de techniques de chromatographie sur papier, dont l'approximation est grande. Ce fait, ajouté aux différences de dates, de lieux de récolte et d'échantillonnages déjà signalées, restreint considérablement la portée des confrontations qui pourront être faites. Elles devront s'appuyer uniquement sur les caractères les plus marqués de la composition en acides aminés libres. Leur signification sera purement qualitative.

Comme chez les Algues vertes de Bretagne, l'histidine et la lysine sont bien représentées chez *Codium decorticatum, Enteromorpha intestinalis* et *Ulva lactuca* analysés par NASR et coll. (1967). Par contre, les espèces indiennes (*Enteromorpha linza, Ulva lactuca var. rigida, Spongomorpha saxatilis, Ulva reticulata, Valoniopsis pachynema, Cladophora Fritschii, Chaetomorpha torta, Codium elongatum* : LEWIS et GONZALVES, 1962 ; LEWIS, 1963) en possèdent seulement de très petites quantités. L'arginine est absente ou n'existe qu'en très faibles concentrations dans la fraction aminée libre de plusieurs de ces Thallophytes. Mais *Ulva lactuca* var. *rigida* (LEWIS et GONZALVES, 1962) et *Ulva articulata* (LEWIS, 1963), tout comme *Ulva lactuca* des côtes bretonnes, ont de l'arginine soluble en quantités appréciables, alors que cette dernière espèce étudiée par NASR et coll., en est dépourvue. Des différences analogues apparaissent pour l'ornithine. Cet acide aminé n'a pas été décelé chez *Ulva lactuca* (en Bretagne et en Egypte) ni *Ulva reticulata* (aux Indes). Mais *Ulva lactuca* var. *rigida* (aux Indes) en possède des quantités appréciables. Les Entéromorphes, quelle que soit leur provenance, présentent de l'ornithine dans leur fraction aminée libre, ainsi que les *Codium,* sauf deux espèces bretonnes. La citrulline, par contre, n'a été signalée que par NASR et coll. chez les Chlorophycées marines macroscopiques.

Les acides aspartique et glutamique sont présents dans tous les échantillons examinés, le plus souvent en concentrations importantes. LEWIS et GONZALVES et LEWIS ont détecté de l'asparagine, notamment chez *Chaetomorpha torta, Enteromorpha linza* et *Ulva articulata.* Mais contrairement aux résultats du présent travail, les échantillons de *Cladophora* et de *Codium* analysés par ces auteurs étaient dépourvus d'amides.

L'alanine et la glycine sont des composés retrouvés dans la fraction aminée libre de toutes les Algues, quelle que soit leur origine. Leurs concentrations, principalement celles de l'alanine, sont habituellement importantes. La valine, les leucines, la sérine, la phénylalanine, la tyrosine et la proline sont, sauf exception, présentes dans tous les échantillons, parfois même en fortes quantités dans le cas de la proline. Par contre, la thréonine et surtout la méthionine, ne sont signalées que chez un nombre restreint d'espèces. A cet égard, les Algues bretonnes se distinguent assez nettement de celles de la Méditerranée et de l'Océan Indien, ces deux derniers acides aminés existant chez toutes les Chlorophycées françaises testées (sauf la méthionine chez *Codium fragile*), en quantités faibles ou assez importantes.

Comme pour les échantillons étudiés dans ce travail, il est possible de constater que certaines espèces méditerranéennes ou indiennes possèdent une composition en acides aminés libres plus complète que d'autres. En effet, seul un nombre très restreint de ces composés a pu être détecté chez quelques Algues (chez *Valoniopsis pachynema* par exemple : LEWIS, 1963).

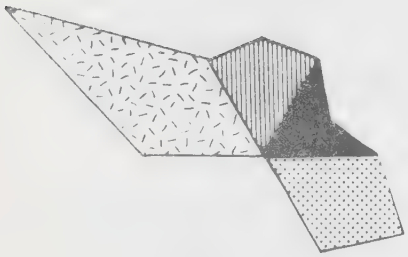
Les acides prépondérants de la fraction aminée libre des Algues vertes analysées par NASR et coll. sont l'acide glutamique, l'alanine, les leucines, la thréonine, l'histidine, la phénylalanine et l'acide aspartique. Pour celles étudiées par LEWIS et GONZALVES et par LEWIS, ce sont l'acide glutamique, la proline, l'asparagine, l'acide aspartique et l'alanine. Ces caractères confèrent à la composition de certaines espèces une physionomie bien particulière. C'est le cas, de *Codium decorticatum*, (importance de l'histidine, NASR et coll.), d'*Ulva reticulata* et de *Valoniopsis pachynema* (beaucoup de proline : LEWIS), d'*Enteromorpha linza* (asparagine) et d'*Ulva lactuca* var. *rigida* (proline : LEWIS et GONZALVES).

Quelle que soit l'origine des échantillons analysés, leur composition en acides aminés libres présente des caractères communs. L'importance de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'alanine chez la grande majorité des Chlorophycées étudiées rapproche ces différents végétaux. Les analogies sont plus marquées entre les espèces bretonnes et indiennes, en raison de la présence des amides et de l'existence de fortes concentrations de proline libre chez plusieurs de ces Thallophytes.

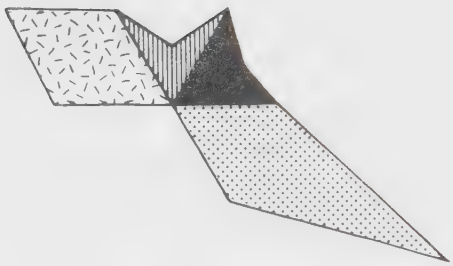
Mais des différences interviennent d'un échantillon à l'autre, même entre ceux qui sont analysés par un seul auteur. Elles sont dues notamment à la thréonine, la méthionine, la citrulline, l'ornithine, l'arginine, la lysine, la phénylalanine et les amides. Les espèces étudiées par NASR et coll. en particulier, se distinguent nettement des autres, par la présence de citrulline et l'absence d'amides dans leur fraction aminée libre.

b. - Les Phéophycées (Tableaux VIII et IX, Fig. 10 à 13)

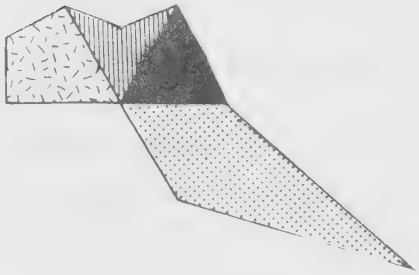
Les amides et dix sept acides aminés ont pu être mis en évidence ou dosés dans les extraits solubles des différentes Phéophycées analysées. La citrulline n'a été détectée chez aucune espèce. La proline, absente chez treize Algues, à l'état de traces chez huit autres, n'est bien représentée que chez les Laminariales et une Fucacée.



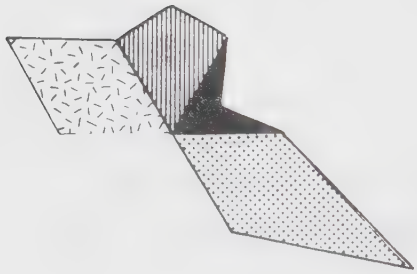
HALOPTERIS SCOPARIA



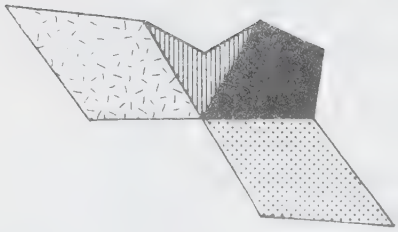
SCYTOSIPHON LOMENTARIA



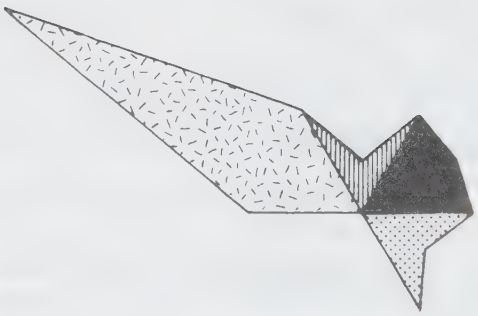
PETALONIA FASCIA



COLPOMENIA PEREGRINA

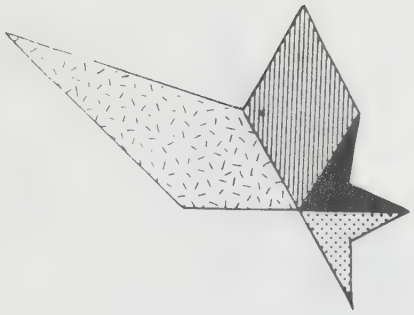


PADINA PAVONIA

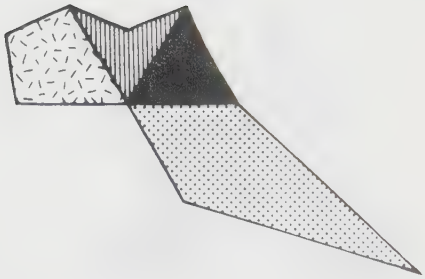


DICTYOPTERIS MEMBRANACEA

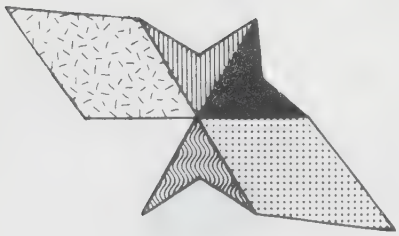
Fig. 10.- Les acides aminés libres prépondérants des Phéophycées.



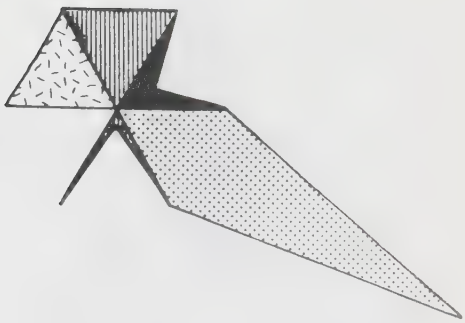
DICTYOTA DICHOTOMA



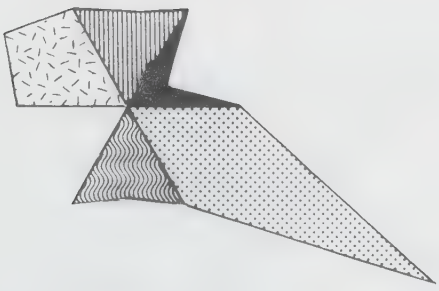
DESMARESTIA LIGULATA



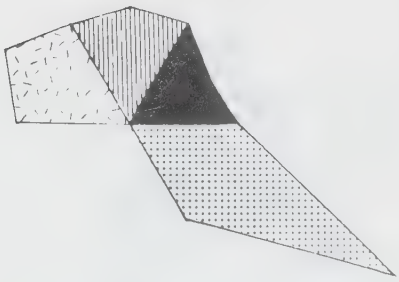
CHORDA FILUM



LAMINARIA DIGITATA



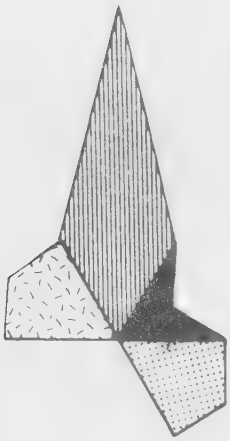
LAMINARIA SACCHARINA



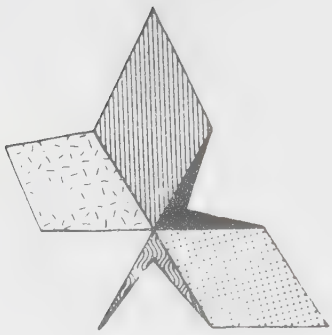
ALARIA ESCULENTA

Fig. 11.- Les acides aminés libres prépondérants des Phéophycées.

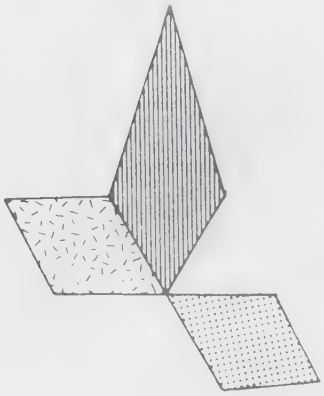
PHEOPHYCEES



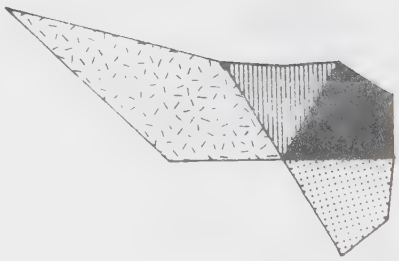
FUCUS SPIRALIS



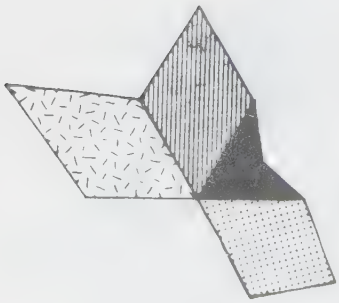
FUCUS VESICULOSUS



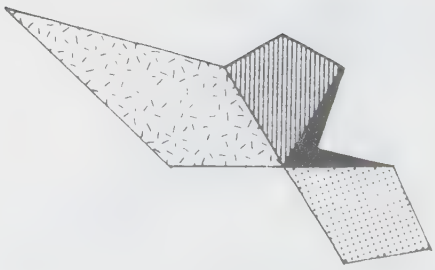
FUCUS MUSCOIDES



FUCUS CERANOIDES



FUCUS SERRATUS



ASCOPHYLLUM NODOSUM

Fig. 12.- Les acides aminés libres prépondérants des Phéophycées.

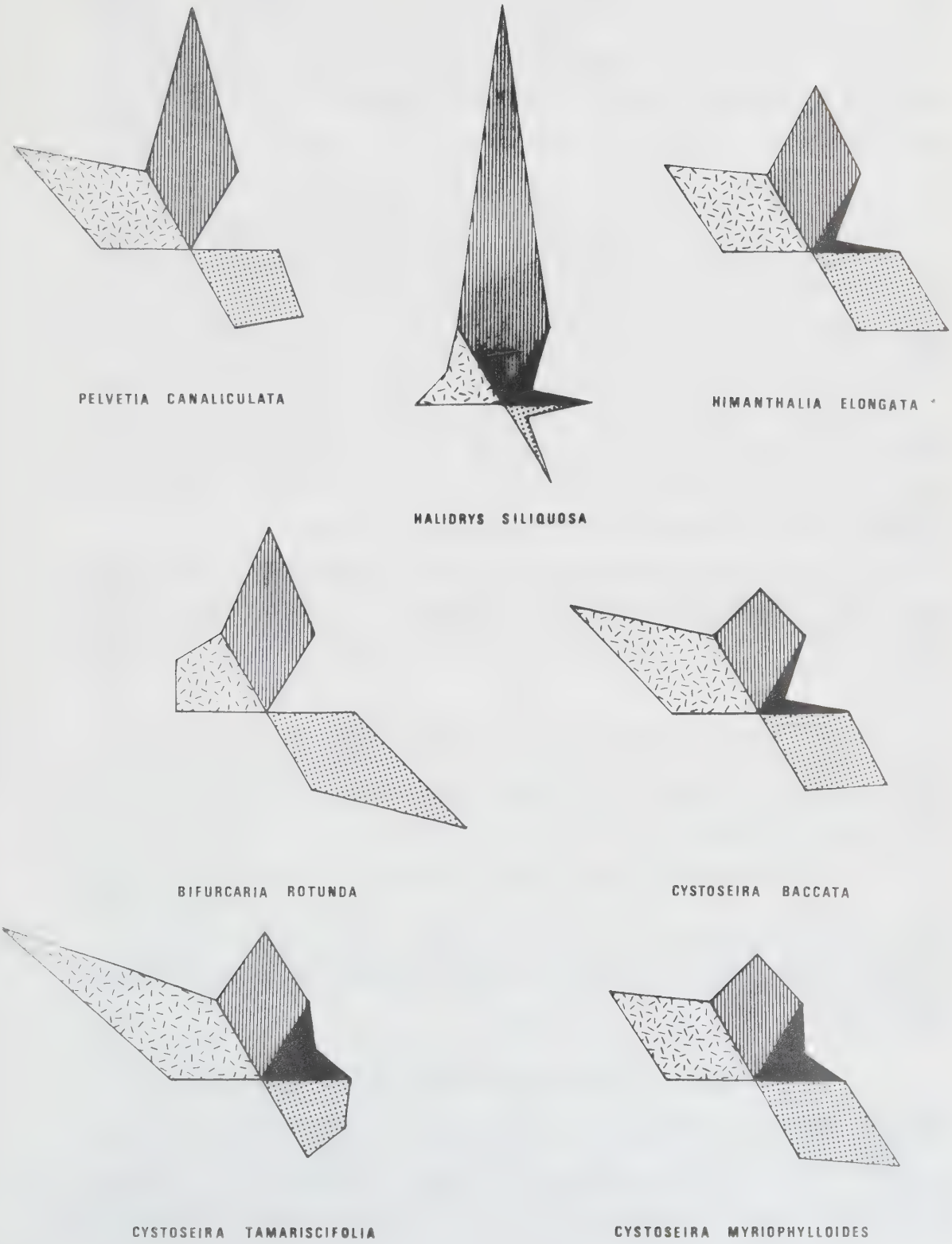


Fig. 13.- Les acides aminés libres prépondérants des Phéophycées.

Parmi les acides aminés basiques, l'arginine occupe une place prépondérante. Présent chez toutes les espèces, à l'état de traces chez *Padina pavonia* et *Dictyopteris membranacea,* en faibles concentrations chez *Halibrys siliquosa* et *Ascophyllum nodosum,* cet aminoacide acquiert une importance quantitative appréciable chez plusieurs Algues, en particulier *Halopteris scoparia, Scytosiphon lomentaria, Desmarestia ligulata, Chorda filum, Alaria esculenta, Fucus spiralis* et *F. muscoides.* Comme l'arginine, la lysine se trouve dans la fraction aminée libre de toutes les Phéophycées analysées, mais en concentrations généralement plus faibles, et à l'état de traces chez *Scytosiphon lomentaria, Padina pavonia, Desmarestia ligulata, Fucus ceranoides* et *Pelvetia canaliculata.* L'histidine, dont les taux sont voisins de ceux de la lysine, est absente chez deux espèces seulement (*Halopteris scoparia* et *Chorda filum*). L'ornithine est moins répandue chez les Algues brunes. Il n'a pas été possible de la doser dans les extraits de dix d'entre elles. Elle a été détectée à l'état de traces chez quatre autres. Les espèces qui en possèdent n'en contiennent que des quantités très faibles (inférieures à 50 µM/1 g d'azote total), la plus forte étant enregistrée pour *Dictyota dichotoma* (99,6 µM/1 g d'azote total).

Les acides aminés dicarboxyliques et leurs amides sont, d'une façon générale, très bien représentés chez les Phéophycées, sauf l'acide aspartique chez quatre espèces (*Fucus serratus, Pelvetia canaliculata, Bifurcaria rotunda* et *Laminaria saccharina*).

L'alanine est également l'un des acides aminés quantitativement les plus importants de la fraction aminée libre. Il peut présenter des concentrations très fortes (*Laminaria digitata*) ou, exceptionnellement pour une espèce, assez faibles (*Halidrys siliquosa*).

Les autres acides aminés libres se rencontrent chez toutes les Algues brunes examinées, sauf la tyrosine (absente chez *Chorda filum* et *Pelvetia canaliculata*) et la phénylalanine (également absente chez *Chorda filum*). Ces deux derniers aminoacides ne se trouvent qu'à l'état de traces chez quelques autres Phéophycées.

La composition en acides aminés libres des échantillons de cette classe est nettement marquée par la prépondérance de l'alanine et de l'acide glutamique, ces composés pouvant se présenter en proportion parfois très importantes : 75 % d'acide glutamique chez *Halidrys siliquosa,* 61 % d'alanine chez *Laminaria digitata.* L'alanine domine la fraction aminée libre de presque toutes les espèces d'Iso- et d'Hétéro-générateées, et l'acide glutamique celle de la majorité des Cyclosporées.

Certains groupes paraissent bien homogènes : les Scytosiphonacées (alanine, acide aspartique), les Laminariacées (alanine, acide glutamique) et le genre *Fucus* (acide glutamique, alanine), *Fucus ceronoides* mis à part (amides, acide aspartique). Les Dictyotacées et les Cystoseiracées, par contre, présentent une diversité relativement grande dans leur composition en acides aminés libres prépondérants.

Les espèces peuvent être individualisées facilement. Il convient de souligner quelques particularités chez certaines d'entre elles. C'est le cas de *Dictyopteris membranacea, Fucus ceranoides* et *Cystoseira tamariscifolia,* pour lesquelles les amides sont les composés majeurs de la fraction aminée libre. De plus, la proline se rencontre rarement à l'état libre chez les Phéophycées, aussi est-il intéressant de noter sa présence chez *Laminaria saccharina* (12 % de la somme des acides aminés solubles), *L. digitata* (4 %) et *Fucus vesiculosus* (4,4 %). La thréonine, de même, atteint un taux élevé (21,7 %) chez *Ascophyllum nodosum,* ce qui est exceptionnel pour les Algues étudiées.

Si l'on compare la composition en acides aminés libres des Phéophycées analysées dans le présent travail à celle d'Algues brunes de la Méditerranée (NASR et coll., 1967), de l'Océan Indien (LEWIS et GONZALVES, 1959 ; LEWIS, 1962) et de l'Océan Pacifique (LANDSBERGER et coll., 1969), des analogies, mais aussi des différences apparaissent entre les résultats.

Les échantillons étudiés par LEWIS et GONZALVES et par LEWIS se distinguent par la proportion très réduite des acides aminés basiques dans leur fraction aminée libre. L'histidine est l'acide aminé rencontré chez le plus grand nombre d'espèces, mais toujours en faibles concentrations. La citrulline, l'ornithine et l'arginine ne sont pratiquement jamais signalées. Les acides aminés basiques libres sont mieux représentés, qualitativement et quantitativement, chez les Algues analysées par NASR et coll. L'ornithine et la lysine existent chez toutes, l'histidine chez deux sur trois, l'arginine et la citrulline chez une espèce (*Cystoseira barbata*).

La composition en acides aminés basiques libres des Phéophycées du Chili (LANDSBERGER et coll.) s'écarte très nettement de celle des espèces qui viennent d'être examinées, bien que l'absence d'ornithine et d'histidine, ou parfois leur existence à l'état de traces, soit un caractère commun à toutes. Mais la présence de citrulline libre, en quantités importantes, chez les trois espèces chiliennes, est un fait inhabituel chez les Algues brunes. Les fortes concentrations d'arginine et de lysine dans ces échantillons ne sont pas davantage habituelles chez ces Thallophytes.

L'absence de citrulline libre chez toutes les espèces bretonnes, comme celle d'ornithine chez plusieurs d'entre elles, et sa présence en faibles quantités chez d'autres, tendent à rapprocher leur composition en acides aminés basiques libres de celles des Algues examinées plus haut. Mais la répartition très large de l'histidine, de la lysine et de l'arginine, ainsi que leurs concentrations pouvant devenir importantes, particulièrement pour ce dernier composé, confèrent aux échantillons des côtes de Bretagne une physionomie particulière.

L'importance de l'acide glutamique, de l'alanine, de l'acide aspartique dans la fraction aminée libre des Phéophycées a été soulignée par plusieurs auteurs (CHANNING et YOUNG, 1953 ; SMITH et YOUNG, 1953 ; COULSON, 1953 ; JONES, 1956). Ce fait, retrouvé chez les Algues brunes de l'Océan Pacifique (au Chili : LANDSBERGER et coll.) et de la Méditerranée (NASR et coll.), est confirmé pour celles des côtes bretonnes. Pourtant, l'acide glutamique libre n'est qu'un constituant secondaire chez les espèces analysées par LEWIS et GONZALVES et par LEWIS. L'acide aspartique n'a guère plus d'importance dans la fraction aminée soluble des Algues indiennes, mais l'alanine par contre, y est toujours l'un des éléments prépondérants. Les amides, bien représentées dans les échantillons de Bretagne et du Chili, existent également dans ceux qui ont été étudiés par LEWIS (1962), mais sont absentes chez les espèces analysées par LEWIS et GONZALVES (1959) et par NASR et coll. (1967).

Parmi les autres acides aminés libres, la méthionine n'a été détectée que chez une seule espèce (*Hydroclathrus clathratus*) par les auteurs précédents. Bien que sa concentration soit généralement faible dans la fraction aminée soluble des Algues brunes étudiées dans le présent travail, elle a été retrouvée chez toutes. La proline libre, par contre, est absente chez plusieurs Phéophycées bretonnes. Mais elle est signalée chez toutes les espèces méditerranéennes, indiennes et pacifiques examinées, sauf chez *Sargassum linifolium* (NASR et coll.). Elle atteint parfois des concentrations importantes, devenant même l'acide aminé prépondérant chez *Hydroclathrus clathratus* et *Dictyopteris muelleri* (LEWIS, 1962).

Comme chez les espèces bretonnes, la tyrosine et la phénylalanine sont, sauf exception, faiblement représentées dans la fraction aminée libre des Algues brunes d'autres régions du globe.

La composition en acides aminés libres des Phéophycées testées dans ce travail est donc beaucoup plus complète (en ce qui concerne les 18 acides retenus pour ces comparaisons) que celle des représentants de cette classe analysés ailleurs. La mise en évidence des acides aminés basiques notamment, n'a pu être réalisée pour plusieurs espèces examinées par LEWIS, LEWIS et GONZALVES, et par NASR et coll. La méthionine, les amides, la phénylalanine, la glycine, n'ont pas été détectées par ces auteurs chez de nombreuses Algues.

Les acides aminés prépondérants de la fraction aminée libre des Phéophycées diffèrent suivant les auteurs. Pour LEWIS et GONZALVES et pour LEWIS, ce sont : l'alanine, la proline, l'acide aspartique, la lysine, la valine, la glycine, la thréonine et la sérine. Pour NASR et coll., cette prépondérance est marquée par l'alanine, l'acide glutamique, les leucines et l'histidine principalement, et pour LANDSBERGER et coll., par l'alanine, l'acide glutamique et l'arginine. Les Algues brunes révèlent donc des compositions bien différentes suivant leur origine et, pour une même provenance, d'un échantillon à l'autre.

Il existe peu d'analogies entre la composition en acides aminés libres des Phéophycées étudiées dans le présent travail et celles qui l'ont été en d'autres régions du globe. Elles reposent essentiellement sur l'importance quantitative de l'alanine libre chez la plupart des espèces examinées et, à un moindre degré, sur celle de l'acide glutamique.

Les différences sont, par contre, bien plus nombreuses. D'une manière générale, la fraction aminée libre des Algues brunes méditerranéennes, indiennes et chiliennes analysées présente un nombre moins grand d'acides aminés (parmi les 18 comparés) que celles des espèces bretonnes. Ce fait est particulièrement sensible pour l'arginine, la lysine, l'histidine, la glycine et la méthionine, qui sont bien mieux représentées dans les échantillons étudiés dans ce

travail. **Mais inversement, la proline n'a été détectée que chez un nombre très réduit de Phéophycées bretonnes, alors que cet acide iminé se rencontre chez pratiquement toutes les autres Algues brunes analysées. L'absence totale de citrulline dans les Thallophytes examinés en Bretagne** les différencie de ceux des côtes du Chili. L'importance de l'acide glutamique libre est un autre caractère particulier aux espèces françaises, qui n'est partagé que par les Algues du Chili examinées par LANDSBERGER et coll.

c. Les Rhodophycées (Tableau X - XI, Fig. 14 à 19)

Les amides et les 18 acides aminés reconnus dans la fraction aminée libre des Algues marines étudiées ont tous été dosés chez les Rhodophycées. La citrulline, en particulier, existe chez une vingtaine d'espèces de cette classe.

Les acides aminés basiques sont généralement bien représentés : l'histidine chez toutes les espèces, ainsi que la lysine, qui ne manque que chez l'une d'entre elles. L'arginine est absente de la fraction aminée libre de trois Algues rouges, et l'ornithine de celle de quatre espèces. Les concentrations de l'histidine sont généralement faibles, mais elles deviennent parfois importantes (*Gracilaria verrucosa* et *Ahnfeltia plicata*). Celles de la lysine sont également peu élevées, mais elles atteignent des valeurs plus grandes chez certaines Algues (*Cystoclonium purpureum, Gigartina acicularis, Lomentaria clavellosa, Cryptopleura ramosa*) ; la plus forte est observée chez *Dilsea carnosa.* Des remarques analogues peuvent être faites pour l'arginine, dont les concentrations, habituellement faibles, augmentent chez certaines espèces (*Dilsea carnosa, Plocamium coccineum, Gymnogongrus griffithsiae, Ahnfeltia plicata, Gigartina teedii*), jusqu'à devenir assez fortes chez *Gracilaria verrucosa.* Trois Rhodophycées : *Cystoclonium purpureum, Gracilaria verrucosa* et *Lomentaria clavellosa* possèdent des concentrations d'ornithine nettement supérieures à celles des autres Algues rouges. En ce qui concerne la citrulline, cet acide aminé occupe une place importante dans la fraction aminée libre des espèces qui en possèdent, *Gigartina teedii* et *Ceramium rubrum* exceptées. Chez quelques unes d'entre elles, la citrulline devient l'acide aminé prépondérant (*Polysiphonia lanosa, Furcellaria fastigiata, Cystoclonium purpureum, Gracilaria verrucosa, Gymnogongrus griffithsiae, Chondrus crispus, Gigartina stellata*).

Les acides dicarboxyliques et les amides sont encore présents chez toutes les Rhodophycées étudiées. L'acide glutamique possède une place prépondérante dans la fraction aminée libre de ces végétaux, mais l'acide aspartique et

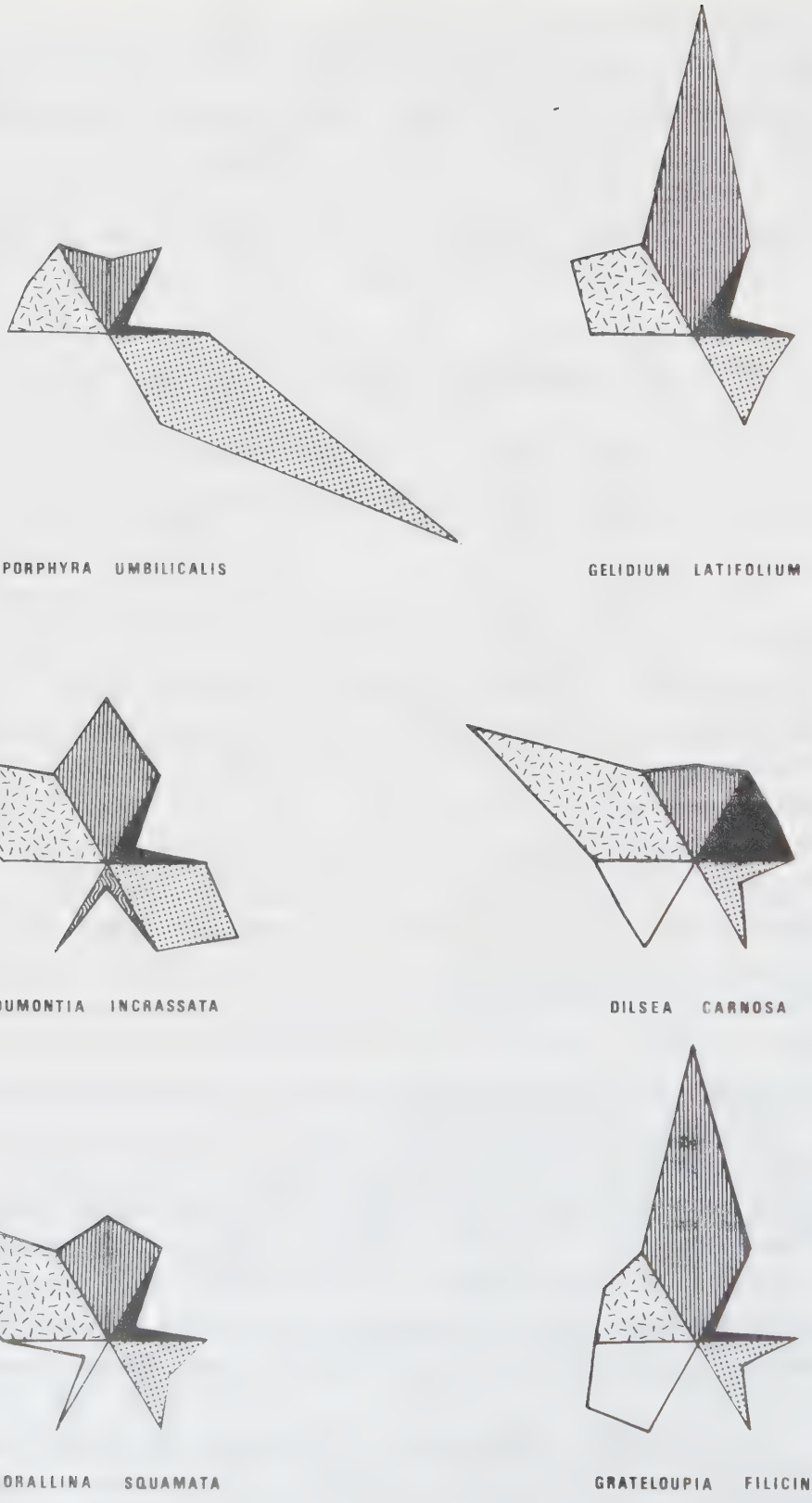
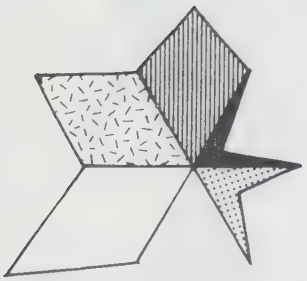
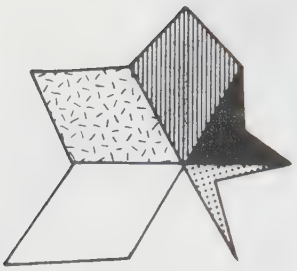


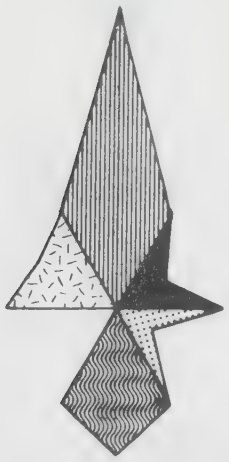
Fig. 14.- Les acides aminés libres prépondérants des Rhodophycées.



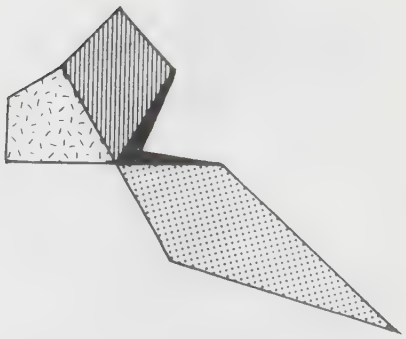
FURCELLARIA FASTIGIATA



CYSTOCLONIUM PURPUREUM

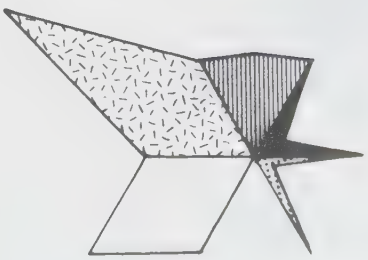


CALLIBLEPHARIS CILIATA



PLOCAMIUM COCCINEUM

SPHAEROCOCCUS CORONOPIFOLIUS



GRACILARIA VERRUCOSA

Fig. 15.- Les acides aminés libres prépondérants des Rhodophycées.

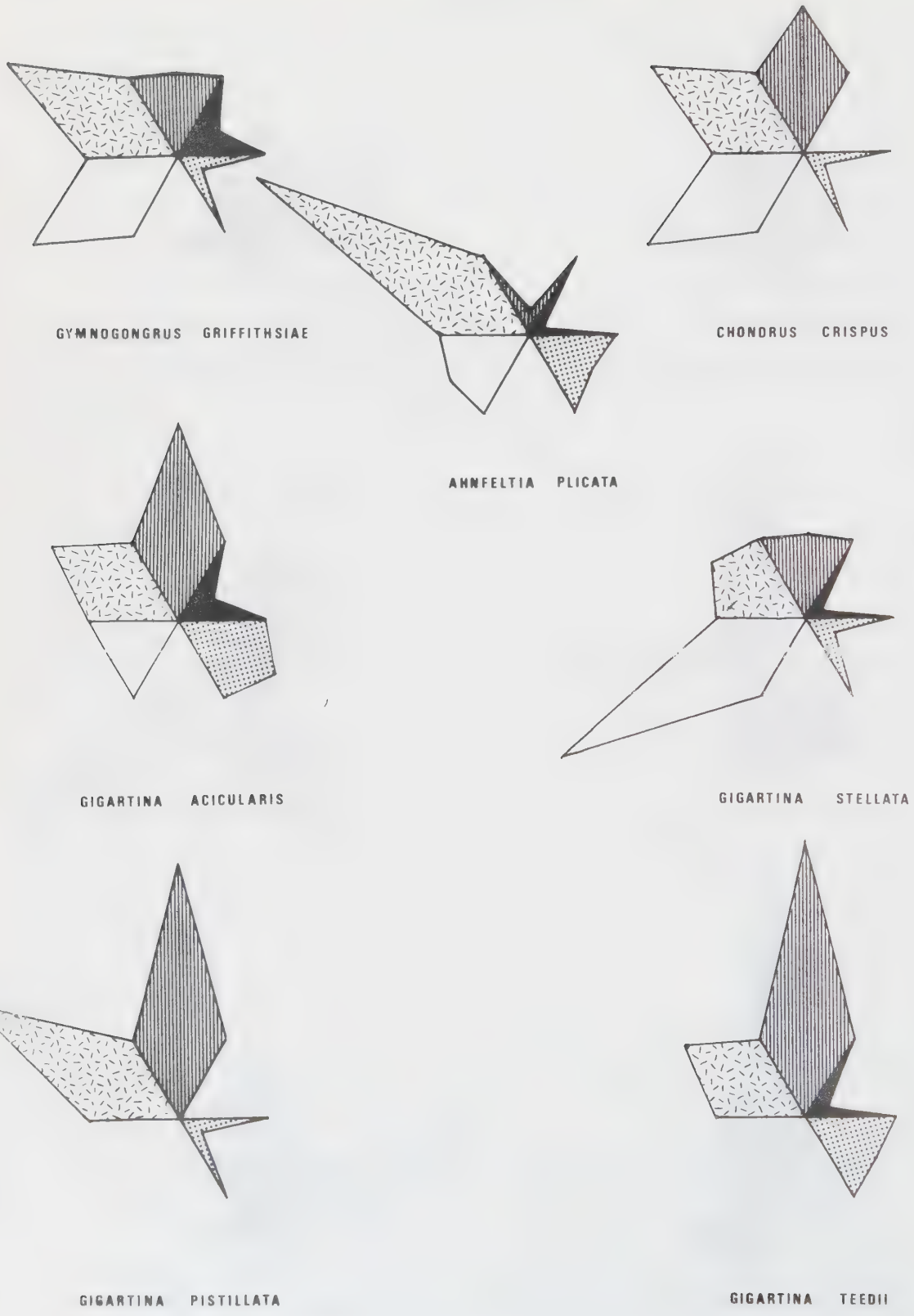
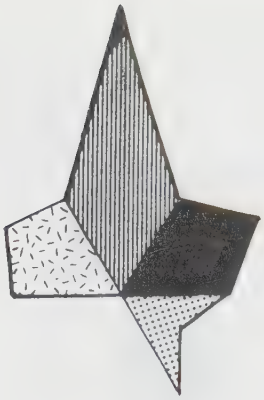
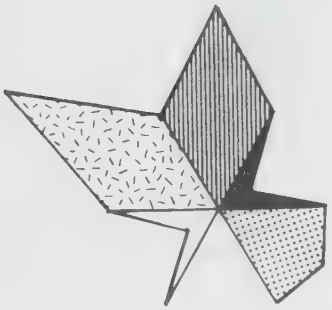


Fig. 16.- Les acides aminés libres prépondérants des Rhodophycées.

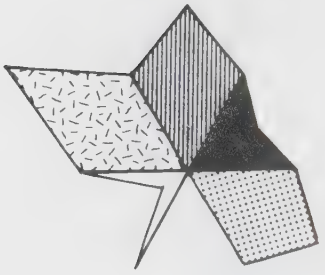
RHODYMENIA PALMATA



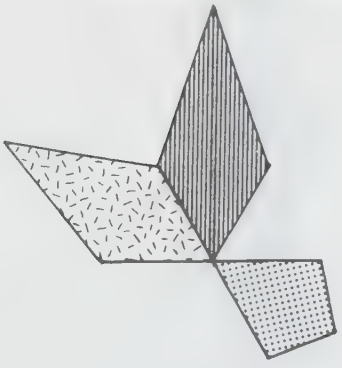
LOMENTARIA ARTICULATA



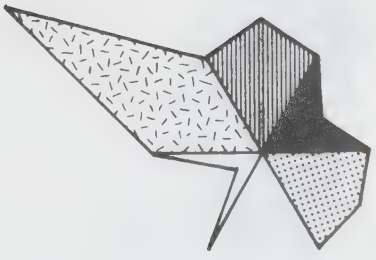
LOMENTARIA CLAVELLOSA



CHYLOCLADIA VERTICILLATA

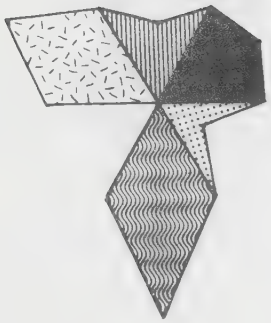


CHYLOCLADIA SQUARROSA



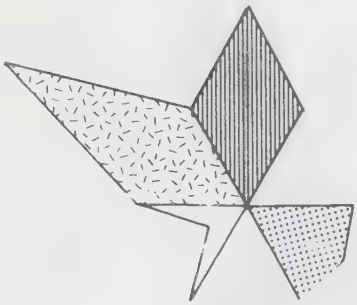
GASTROCLONIUM OVATUM

Fig. 17.- Les acides aminés libres prépond-erants des Rhodophycées.

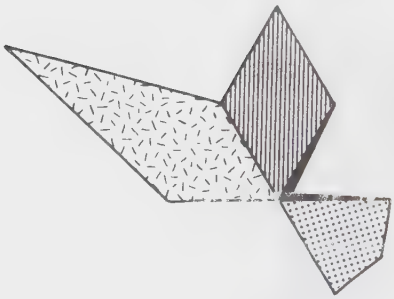


CERAMIUM FLABELLIGERUM

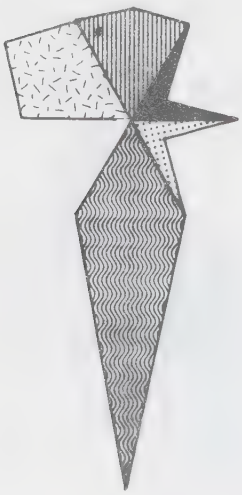
CERAMIUM RUBRUM



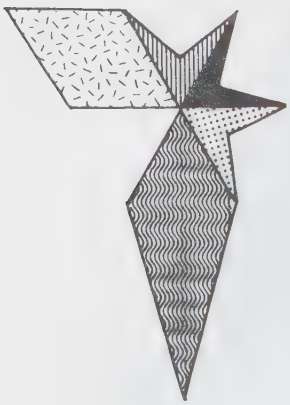
BORNETIA SECUNDIFLORA



GRIFFITHSIA FLOSCULOSA

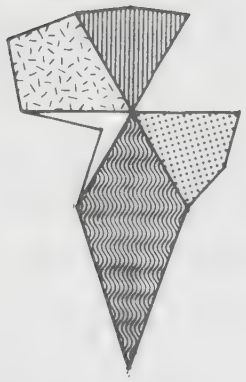


DELESSERIA SANGUINEA

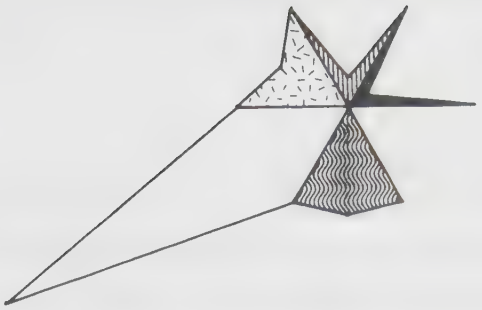


CRYPTOPLEURA RAMOSA

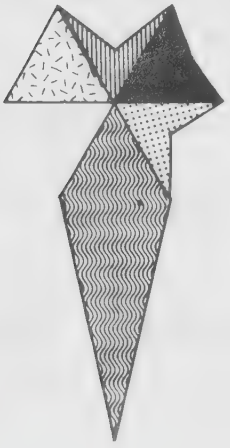
Fig. 18.- Les acides aminés libres prépondérants des Rhodophycées.



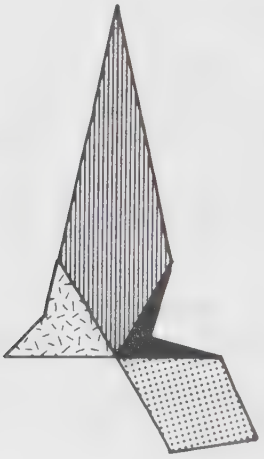
POLYSIPHONIA ELONGATA



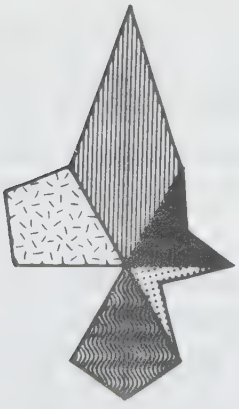
POLYSIPHONIA LANOSA



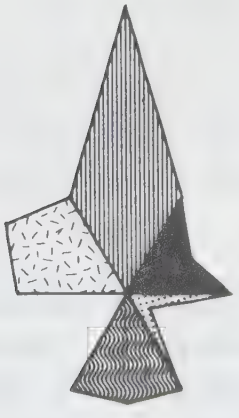
POLYSIPHONIA NIGRESCENS



LAURENCIA OBTUSA



LAURENCIA HYBRIDA



LAURENCIA PINNATIFIDA

Fig. 19.- Les acides aminés libres prépondérants des Rhodophycées.

les amides ont ici une importance plus réduite que chez les Chlorophycées et les Phéophycées. L'acide aspartique peut être très faiblement représenté (*Polysiphonia elongata, Chylocladia squarrosa, Gigartina pistillata, Chondrus crispus, Bornetia secundiflora*).

Les concentrations de l'alanine, exceptionnellement faibles (*Chondrus crispus* et *Gigartina pistillata*), sont habituellement fortes (*Porphyra umbilicalis, Plocamium coccineum* notamment). Celles de la glycine sont moyennes et relativement homogènes d'une espèce à l'autre.

Les autres acides aminés sont généralement présents en concentrations assez faibles, sauf exceptions : la valine (*Griffithsia flosculosa, Gastroclonium ovatum, Bornetia secundiflora, Chylocladia verticillata, Grateloupia filicina*), la méthionine (*Gastroclonium ovatum, Gymnogongrus griffithsiae),* la phénylalanine (*Furcellaria fastigiata, Polysiphonia nigrescens, Polysiphonia lanosa*). Certains d'entre eux sont absents dans les échantillons de quelques espèces : la thréonine (*Chylocladia verticillata, C. squarrosa, Polysiphonia elongata*), la valine (*Ceramium rubrum, Cryptopleura ramosa*), la méthionine (*Calliblepharis ciliata, Lomentaria clavellosa, Gastroclonium ovatum, Ceramium rubrum* et *Polysiphonia elongata*),...

Il apparaît donc que si l'acide glutamique et l'alanine conservent une place importante dans la fraction aminée libre des Rhodophycées, d'autres acides aminés peuvent y devenir les composés majeurs, la proline et la citrulline en particulier, mais aussi la lysine, l'histidine et la méthionine.

Aucun groupe ne se distingue nettement par la prépondérance d'un acide aminé donné. Il est toutefois possible de constater que les Gigartinales constituent l'ordre dans lequel la citrulline est la mieux représentée : elle y est prépond érante chez six espèces sur treize étudiées, et en seconde position chez deux autres. De même, les Céramiales sont les Algues chez lesquelles la proline occupe une place primordiale dans la fraction aminée libre : elle s'y trouve en première position chez six espèces sur douze, et en seconde place chez deux autres.

Il faut aussi remarquer que les espèces de certains genres présentent une homogénéité relative : *Gigartina,* avec *G. acicularis* (acide glutamique et citrulline prépondérants) et *G. stellata* (citrulline et acide glutamique), *G. pistillata* et *G. teedii* (acide glutamique), ainsi que les deux *Ceramium* (proline) et les trois

Laurencia (acide glutamique).

Chaque espèce présente toujours, néanmoins, une individualité bien marquée au sein des Rhodophycées. C'est le cas par exemple, de *Dilsea carnosa* (à lysine prépondérante), d'*Ahnfeltia plicata* (à histidine) , de *Gastroclonium ovatum* (à méthionine) et de *Gracilaria verrucosa,* pour laquelle la citrulline et l'arginine constituent plus de 50 % de la valeur de la fraction aminée libre.

Comme pour les Chlorophycées et les Phéophycées, des ressemblances et des différences apparaissent encore entre les résultats obtenus pour la composition en acides aminés libres des Rhodophycées marines des côtes bretonnes et pour celle d'espèces d'autres régions du globe.

La composition en acides aminés basiques libres des espèces testées par LEWIS et GONZALVES (1959-1962) et par NASR et coll. (1967) est très différente de celle des Algues rouges bretonnes. Ces auteurs, LEWIS et GONZALVES principalement, signalent en particulier des quantités importantes d'ornithine libre dans leurs échantillons. Si cet acide aminé a été détecté dans la plupart des extraits des Rhodophycées étudiées dans le présent travail, ses concentrations sont généralement très faibles ou faibles, sauf rares exceptions (*Cystoclonium purpureum, Gracilaria verrucosa, Lomentaria clavellosa*). L'histidine, l'arginine et la lysine ont une répartition presque générale chez les Algues rouges examinées. Mais leurs concentrations, faibles pour ces Thallophytes en Bretagne, n'ont pu être chiffrées pour la majorité de ceux que LEWIS et GONZALVES et NASR et coll. ont analysés. Il faut toutefois signaler que, pour *Gracilaria confervoides,* ces derniers auteurs mentionnent des quantités importantes d'arginine et d'ornithine libres. Ce fait est à rapprocher de ce qui a été observé pour cette même Algue qui, sur les côtes bretonnes, possède également ces deux acides aminés en fortes concentrations. La présence de citrulline libre chez les trois espèces méditerranéennes et chez deux des cinq échantillons de l'Océan Indien (LEWIS et GONZALVES), traduit une répartition de cet acide aminé analogue à celle qui est constatée pour les Algues rouges de Bretagne. Mais une grande différence existe entre ces deux séries de résultats. Dans le présent travail, la citrulline atteint une importance quantitative beaucoup plus grande que dans ces autres recherches.

L'acide glutamique est un élément constant de la fraction aminée libre des Rhodophycées analysées. Il en constitue une partie prépondérante chez tous les échantillons, quelle que soit leur origine, *Grateloupia indica* excepté (LEWIS et GONZALVES, 1962). L'importance de l'acide aspartique est, d'une façon générale, beaucoup plus réduite. Il peut toutefois être l'acide aminé libre le mieux représenté quantitativement (chez *Champia somalensis,* LEWIS et GONZALVES, 1962). Les amides (l'asparagine uniquement) ne sont signalées, par les auteurs précédents, que chez deux Algues rouges (*Grateloupia indica* et *Champia somalensis*). NASR et coll. ne les ont pas détectées.. Chez les Algues bretonnes, bien que leurs faibles concentrations (sauf pour *Laurencia hybrida* et *L. pinnatifida*) n'ait pas permis de les doser chez de nombreuses espèces, leur répartition paraît générale.

Comme chez les Rhodophycées des côtes de Bretagne, l'alanine libre est l'un des acides aminés prépondérants chez celles de la Méditerranée et de l'Océan Indien étudiées par les auteurs cités plus haut. La glycine, dont les concentrations sont plus faibles que celles de l'alanine, est pourtant l'un des aminoacides les mieux représentés dans la fraction aminée libre des Algues rouges. Elle n'est absente que chez *Grateloupia indica* (LEWIS et GONZALVES, 1962).

TABLEAU X

*Répartition des acides aminés libres prépondérants dans différentes parties du thalle d'*Enteromorpha intestinalis *(31.5.1965) (en micromoles pour 1 gramme de poids sec)*

	Base du thalle		Milieu du thalle		Extrémité du thalle	
	µM/1 g	%	µM/1 g	%	µM/1 g	%
Amides + sérine	38,8	35,5	71,4	31,0	50,7	31,5
Alanine	20,3	18,7	58,8	25,7	36,1	22,4
Acide glutamique	17,3	16,0	37,8	16,8	26,7	16,6

TABLEAU XI

*Répartition des acides aminés libres prépondérants dans différentes parties du thalle d'*Himanthalia elongata *(21.4.1966) (en micromoles pour 1 gramme de poids sec)*

	Base du thalle (partie végétative)		Lanières			
			Base		Extrémité	
	µM/1 g	%	µM/1 g	%	µM/1 g	%
Acide glutamique	9,5	23,1	52,2	34,2	77,5	30,7
Alanine	12,8	31,1	49,0	32,1	71,2	28,9
Sérine + amides	6,7	16,3	18,8	12,3	63,4	25,5
Acide aspartique	7,0	17,0	8,7	5,7	6,4	2,6

Dans les tableaux X, XI, XII et XIII, les pourcentages correspondent à la proportion de chaque acide aminé dans la fraction aminée libre.

Les résultats obtenus dans le présent travail confirment les analyses de LEWIS et GONZALVES et de NASR et coll. en ce qui concerne l'importance acquise par la proline libre chez un assez grand nombre d'espèces. La proline est prépondérante dans la fraction aminée libre de *Grateloupia indica* (LEWIS et GONZALVES, 1962) et de *Pterocladia capillacea* (NASR et coll., 1967), et bien représentée chez d'autres Algues rouges.

La sérine, la valine, les leucines et la thréonine sont signalées chez pratiquement toutes les Rhodophycées étudiées par les auteurs précédents. L'un ou l'autre de ces composés peut représenter une quantité relativement importante de la fraction aminée libre de certaines Algues.

Comme pour les échantillons des côtes de Bretagne, la tyrosine, la phénylalanine, et la méthionine ne sont que des constituants mineurs, quantitativement, de la fraction aminée soluble des Rhodophycées méditerranéennes et indiennes. La méthionine plus particulièrement, est mal représentée chez les espèces examinées par LEWIS et GONZALVES et par NASR et coll.

L'importance de l'acide glutamique et de l'alanine dans la fraction aminée libre des échantillons étudiés par LEWIS et GONZALVES (1959-1962) et par NASR et coll. (1967) constitue le point commun le plus net entre la composition de ces Algues et de celles qui ont fait l'objet de la présente analyse. D'autres analogies, portant notamment sur l'acide aspartique, généralement bien représenté chez toutes les espèces, ou sur la prépondérance de la proline chez certaines Rhodophycées, peuvent être notées. Des résultats comparables ont également été acquis pour d'autres acides aminés libres, la glycine, la thréonine, la valine, les leucines, la tyrosine, la phénylalanine et la sérine.

Mais les Algues rouges des côtes de Bretagne possèdent des caractères propres qui ne semblent pas avoir été retrouvés ailleurs, en particulier l'importance quantitative primordiale qu'occupe la citrulline chez un nombre relativement grand d'espèces. Les acides aminés basiques, d'une façon générale, l'ornithine mise à part, représentent une plus grande proportion de la fraction aminée libre chez les Rhodophycées bretonnes. De même, la place occupée par les amides dans cette fraction azotée est plus importante chez les échantillons analysés dans le présent travail.

Remarque. - Pour obtenir une première indication sur les variations qui affectent les concentrations des différents acides aminés libres des Algues marines bretonnes, quelques dosages préliminaires ont été réalisés.

Des analyses de la fraction aminée libre ont été effectuées dans différentes parties du thalle d'*Enteromorpha intestinalis* (Tableau X) et d'*Himanthalia elongata* (Tableau XI). Les concentrations de chaque acide aminé, exprimées en micromoles par gramme de poids sec, sont très différentes suivant la portion de l'appareil végétatif examinée. Mais leurs pourcentages, par rapport à la somme des acides aminés libres de chaque échantillon, varient dans des limites beaucoup plus restreintes. De plus, l'ordre de prépondérance des aminoacides reste le même dans tous les cas, sauf pour la base du thalle d'*Himanthalia elongata*.

TABLEAU XII

Les acides aminés libres prépondérants
à différents stades du développement de Fucus spiralis *(17.1.1964)*
(en micromoles pour 1 gramme de poids sec)

	Jeune		Moyen		Adulte	
	µM/1 g	%	µM/1 g	%	µM/1 g	%
Acide glutamique	10,9	51,9	32,7	46,4	35,6	50,8
Alanine	4,5	21,3	12,1	17,1	13,7	19,5
Acide aspartique	2,4	11,2	7,1	10,0	7,2	10,2
Sérine + amides	1,6	7,4	5,5	7,7	2,1	3,0

TABLEAU XIII

Les acides aminés libres prépondérants de Polysiphonia lanosa
à différentes époques de l'année
(en micromoles pour 1 gramme de poids sec)

Acides aminés libres	Janvier 1966		Avril 1966		Septembre 1966	
	µM/1 g	%	µM/1 g	%	µM/1 g	%
Ornithine	+		0,5	0,1	+	
Arginine	4,5	1,0	1,0	0,2	0,2	0,1
Citrulline	273,7	62,3	284,4	66,1	77,4	49,9
Acide aspartique	16,3	3,9	8,4	1,9	7,9	5,0
Acide glutamique	20,9	4,9	10,8	2,5	17,5	11,2
Alanine	5,9	1,4	12,0	2,9	5,8	3,7
Glycine	5,2	1,2	2,4	0,5	2,0	1,2
Proline	68,8	15,6	72,5	16,9	22,1	14,2
TOTAL	438,5		430,1		154,6	

D'autres dosages ont été entrepris sur des lots d'individus de *Fucus spiralis* qui présentaient différents stades de développement (Tableau XII). Les concentrations des acides aminés libres, en micromoles par gramme de poids sec, présentent encore des différences, principalement entre les stades "jeune " et "moyen ". Ce dernier stade et "l'adulte", par contre, possèdent des quantités comparables d'acides aminés libres. Mais dans ce cas encore, les valeurs de chaque aminoacide, en pourcentages de leur somme dans chaque échantillon, sont très voisines. En outre, l'ordre de prépondérance des acides aminés quantitativement les plus importants dans la fraction azotée soluble, est le même à tous les stades de développement étudiés.

Enfin, le dosage de la fraction aminée libre d'échantillons de *Polysiphonia lanosa* récoltés à différentes époques de l'année (Tableau XIII) a été effectué. Les résultats permettent de constater des variations quantitatives importantes, essentiellement entre les échantillons d'hiver et de printemps d'une part, et ceux de la fin de l'été d'autre part. Le développement de cette Rhodophycée est très ralenti pendant la période estivale, ce qui peut expliquer la baisse importante de la concentration des acides aminés libres enregistrée en septembre. Mais l'ordre de prépondérance des trois acides aminés quantitativement les plus importants de la fraction aminée libre reste le même à toute époque de l'année.

5. - Les acides aminés des hydrolysats de la fraction azotée insoluble

Le travail récent de PELLEGRINI (1968), qui porte sur l'analyse des hydrolysats de poudres sèches de 41 espèces de Rhodophycées méditerranéennes, constitue une contribution importante à la connaissance des acides aminés combinés des Algues marines. Toutefois, les acides aminés libres n'ont pas été extraits avant l'hydrolyse. Les valeurs fournies par l'auteur correspondent donc aussi, en partie, à ces composés. Il ressort de ces résultats que la composition en acides aminés combinés est nettement dominée par l'acide glutamique et l'acide aspartique. L'alanine, la glycine, l'isoleucine, la leucine, la valine, la thréonine, la sérine, l'arginine, la lysine et la proline sont également bien représentées. La cystine, la méthionine, la tyrosine et la phénylalanine existent en concentrations moins importantes, alors que l'histidine et le tryptophanne n'atteignent habituellement que de très faibles valeurs.

Ces résultats s'accordent, dans leur ensemble, avec ceux d'autres auteurs, en particulier ceux de LEWIS et GONZALVES (1959-1964), qui concernent des Algues rouges des côtes de l'Inde. Toutefois, et d'une manière générale pour tous les travaux qui traitent de ce sujet, des différences qualitatives, faibles, et quantitatives, importantes, apparaissent entre les compositions des espèces étudiées. Si les acides aminés prépondérants dans les hydrolysats sont bien souvent les mêmes que ceux signalés par PELLEGRINI, chaque espèce présente une "physionomie" particulière, qui ne peut être superposée à celle d'aucune autre. L'originalité de certains échantillons est due à l'existence, dans leurs protéines, d'acides aminés rares chez ces végétaux marins : béta-alanine, acides alpha- et gamma- aminobutyrique, hydroxyproline, homocystine, ornithine, citrulline.

TABLEAU XIV

Acides aminés des protéines totales
(en pourcentages de la somme des acides aminés)

	Ulva lactuca	*Enteromorpha intestinalis*	*Codium dichotomum*	*Laminaria saccharina*	*Fucus spiralis*	*Fucus serratus*	*Halidrys siliquosa*	*Bifurcaria rotunda*	*Ahnfeltia plicata*	*Polysiphonia lanosa*
Histidine	1,6	1,7	1,5	1,1	1,9	1,5	1,4	1,2	1,0	4,6
Lysine	5,2	2,4	6,0	3,8	4,9	5,9	4,4	2,9	6,3	7,0
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	4,3	3,5	2,4	2,0	1,6	3,0	2,9	1,7	8,0	5,1
Acide aspartique	0,8	7,5	9,0	11,5	12,1	13,9	9,9	5,1	11,0	11,4
Acide glutamique	12,3	14,5	15,4	16,9	16,3	24,5	24,8	16,4	10,3	8,4
Alanine	13,9	11,5	12,3	22,9	11,1	11,6	12,7	10,7	9,6	7,8
Glycine	12,1	11,5	9,2	11,0	10,2	6,8	8,2	8,0	9,4	9,6
Proline	6,1	10,4	8,2	+	3,7	+	+	16,8	6,8	5,6
Thréonine	5,8	4,6	6,3	5,3	6,0	2,4	6,9	5,2	6,2	5,1
Sérine	7,4	5,9	5,4	6,2	6,8	6,0	6,9	7,9	7,1	7,0
Valine	6,6	5,9	4,3	6,2	6,5	6,0	6,4	5,2	2,7	7,0
Méthionine	1,7	1,1	1,2	0,1	4,8	0,2	0,3	0,5	2,9	1,1
Isoleucine	4,6	4,5	4,4	3,4	4,5	4,5	2,5	3,8	5,8	5,6
Leucine	9,5	8,6	9,4	5,7	4,2	7,8	7,4	6,6	6,7	7,7
Tyrosine	2,0	1,8	1,5	0,1	1,4	2,0	0,9	1,8	1,9	4,0
Phénylalanine	5,1	4,2	4,4	3,4	3,4	3,9	3,7	3,7	4,4	3,9

Quant aux protéines isolées, l'hydrolyse acide des chromoprotéines de *Porphyra tenera* (FUJIWARA, 1955-1958), de trois espèces de *Porphyra* (JONES et BLINKS, 1957) et de *Ceramium rubrum* (RAFTERY et O'HEOCHA, 1965) a montré que, si les mêmes acides aminés étaient présents dans tous les hydrolysats, des différences quantitatives intervenaient toutefois pour chacun d'eux, d'un échantillon à l'autre. Dans tous les cas, les acides dicarboxyliques dominaient. Alanine et leucine étaient les mieux représentés parmi les acides aminés neutres, alors que les basiques existaient toujours en faibles concentrations.

L'hydrolyse acide du résidu d'extraction des composés solubles d'une dizaine d'espèces d'Algues marines des côtes bretonnes a permis d'obtenir une première indication sur la composition en acides aminés combinés des plantes étudiées (Tableau XIV).

Cette composition est, qualitativement, presque la même que celle de la fraction aminée libre. L'hydroxyproline apparaît dans quelques hydrolysats et la proline est présente dans tous. Le tryptophanne a pu être mis en évidence dans l'hydrolysat alcalin de plusieurs espèces. L'ornithine est absente chez toutes les Algues examinées.

Quantitativement, les acides aminés basiques sont beaucoup mieux représentés qu'à l'état libre, principalement la lysine et l'arginine. Mais les acides prépondérants demeurent les mêmes : acide aspartique, acide glutamique, alanine et glycine, ce dernier ayant une importance voisine de celles des précédents. La sérine et la leucine sont assez abondantes, principalement chez quelques Chlorophycées et Rhodophycées.

Chez les Chlorophycées, la composition de l'hydrolysat d'*Ulva lactuca* se distingue par sa faible teneur en acide aspartique. Chez *Enteromorpha intestinalis* et *Codium dichotomum,* cet acide présente des pourcentages nettement plus élevés. La place occupée par la proline dans les hydrolysats de ces deux dernières Algues vertes est également plus importante, surtout chez *Enteromorpha intestinalis.*

Chez les Phéophycées, les pourcentages de l'arginine et de la proline sont plus faibles pour toutes les espèces analysées, *Bifurcaria rotunda* exceptée, cette Algue possédant une forte proportion de proline dans son hydrolysat. L'acide glutamique (*Fucus serratus* et *Halidrys siliquosa*) et l'alanine (*Laminaria*

saccharina) acquièrent aussi une plus grande importance au sein de cette fraction aminée.

On note chez les Rhodophycées, par rapport aux deux classes précédentes, des valeurs sensiblement plus fortes pour l'arginine et la lysine. L'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine et la glycine présentent les pourcentages les plus élevés, ceux-ci étant du même ordre de grandeur pour ces quatre acides aminés.

La comparaison des résultats de ces analyses avec ceux obtenus par ailleurs permet de dégager certains traits de la composition en acides aminés combinés des Algues marines.

D'une façon générale, les acides aminés basiques sont bien représentés dans les hydrolysats. Parmi eux, l'histidine et l'arginine sont prédominants chez les Thallophytes étudiés par LEWIS (1962-1963), LEWIS et GONZALVES (1962) et NASR et coll. (1967). Mais chez les 41 Rhodophycées analysées par PELLEGRINI (1969), comme chez les 10 échantillons examinés dans le présent travail, la prépondérance est marquée par la lysine et l'arginine. L'ornithine, contrairement aux résultats se rapportant aux Algues bretonnes et méditerranéennes (PELLEGRINI), est signalée dans pratiquement tous les hydrolysats préparés par LEWIS, LEWIS et GONZALVES et NASR et coll. La citrulline n'est détectée que chez deux Chlorophycées (LEWIS, 1963). L'absence de cet acide aminé dans les protéines de la majorité des espèces analysées confirme les observations faites pour celles des côtes bretonnes.

L'acide glutamique est habituellement l'acide aminé quantitativement le plus important de cette fraction azotée. Sa prépondérance n'est pourtant pas aussi marquée chez les Algues indiennes et méditerranéennes (NASR et coll.) que dans celles de Bretagne. Dans tous ces échantillons, on rencontre une proportion plus réduite d'acide aspartique. Toutefois, contrairement à ce que l'on peut observer dans le présent travail, ce sont les Chlorophycées et les Phéophycées, particulièrement celles de l'Océan Indien, qui en possèdent le plus (LEWIS, 1962). Cet acide aminé est faiblement représenté dans les hydrolysats de Rhodophycées obtenus par NASR et coll. ainsi que par LEWIS et GONZALVES. Mais les Algues testées par PELLEGRINI, comme celles de Bretagne, présentent une quantité appréciable d'acide aspartique dans leurs hydrolysats.

L'alanine et la glycine occupent, dans les protéines totales des espèces étudiées aux Indes, une place quantitativement moins grande que dans celles des Algues bretonnes et méditerranéennes.

La proline et les leucines peuvent être parmi les acides aminés prédominants de la fraction protéique de certaines espèces (LEWIS, LEWIS et GONZALVES, NASR et coll.). Ils constituent toujours une proportion importante de cette fraction azotée.

Les autres acides aminés : thréonine, valine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, sérine, existent en concentrations plus réduites dans tous les échantillons, quelle que soit leur origine. Toutefois, certains d'entre eux occupent la première place chez quelques espèces, la phénylalanine (LEWIS et GONZALVES ; NASR et coll.), la thréonine et la valine (NASR et coll.) en particulier.

TABLEAU XV

Comparaison de la composition en acides aminés de différentes protéines

	His.	Lys.	Orn.	Arg.	Asp.	Glu.	Ala.	Gly.	Pro.	Thr.	Sér.	Val.	Mét.	Ileu.	Leu.	Tyr.	Phé.
1 - Albumines	4,3	7,9	-	13,0	8,0	8,2	7,2	6,7	4,2	3,4	4,1	5,8	1,4	4,1	5,7	2,5	3,0
2 - Globulines	3,1	6,3	-	22,0	5,6	7,0	0,6	10,7	2,7	2,4	3,9	4,1	0,9	2,2	4,5	1,4	2,1
3 - Prolamines	2,2 2,8	0,0 0,8	- -	3,4 6,0	0,8 3,0	23,3 24,6	1,9 10,2	0,0 1,7	7,9 15,3	1,4 2,5	3,2 5,8	1,8 3,5	0,7 1,4	7,2 14,8		1,4 2,5	3,1 3,6
4 - Glutélines	4,3	4,8	-	12,0	4,7	11,7	6,6	5,2	6,6	3,1	4,2	4,9	1,1	3,5	5,8	1,9	2,7
5 - Protéines cytoplasmiques	2,2 4,1	6,2 7,1	- -	14,1 15,0	5,5 6,4	6,5 8,1	0 7,9	0 6,7	0 4,1	0 4,0	0 3,5	0 4,9	0 1,4	0 4,2	0 5,9	- 2,3	- 3,0
6 - Prot. chloroplastiques	3,3	4,7	-	13,9	5,8	6,5	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	2,6	-
7 - Prot. de pomme de terre	-	9,6	-	12,0	7,9	8,7	6,1	6,5	2,7	2,3	3,1	5,9	0,9	11,7		1,9	6,7
8 - Prot. de la mosaïque du Tabac	-	1,6	-	18,3	8,6	6,5	4,8	2,1	4,3	6,4	5,8	6,6	0	4,2	6,0	1,7	4,3
9 - Prot. de *Nitrosomonas*	3	8	-	8	5	8	8	8	4	4	2	7	2	4	3	1	4
10 - Protéines totales d'Algues unicellulaires	2,5 3,7	6,6 10,2	- -	9,2 15,9	5,1 6,9	4,6 7,8	6,0 8,4	5,5 6,2	5,0 6,2	2,9 5,7	2,4 4,2	5,5 7,5	1,2 1,4	3,5 4,1	6,1 7,4	1,6 3,0	2,8 3,4
11 - Protéines totales d'Algues d'eau douce	0,3 1,2	4,2 4,9	0,6 2,8	2,5 3,3	7,4 10,0	6,9 9,6	11,0 14,1	7,5 8,4	4,5 9,4	7,7 9,4	8,6 9,0	1,6 2,3	1,0 1,3	3,6 4,0	5,0 7,2	1,0 4,9	2,1 3,7
12 - Chromoprotéines de *Porphyra*	+ 2,1	1,4 6,5	- -	1,1 7,1	5,4 15,3	8,7 17,5	9,5 20,3	5,2 13,3	2,9 6,2	1,6 8,6	0,2 8,9	3,1 11,7	3,1 9,1	5,1 12,2		0 5,0	2,0 10,7
13 - Chlorophycées marines	1,5 1,7	2,4 6,0	- -	2,4 4,3	0,8 9,0	12,3 15,4	11,5 13,9	9,2 12,1	6,1 10,4	4,6 6,3	5,4 7,4	4,3 6,6	1,1 1,7	4,4 4,6	8,6 9,5	1,5 2,0	4,2 5,1
14 - Phéophycées marines	1,1 1,9	2,9 5,9	- -	1,6 3,0	5,1 13,9	16,2 24,2	10,7 22,9	6,8 11,0	+ 16,8	2,4 6,9	6,0 7,9	5,2 6,5	0,1 4,8	2,5 4,5	4,2 7,8	0,1 2,0	3,4 3,9
15 - Rhodophycées marines	1,0 4,6	6,3 7,0	- -	5, 8,0	11,0 11,4	8,4 10,3	7,8 9,6	9,4 9,6	5,6 6,8	5,1 6,2	7,0 7,1	2,7 7,0	1,1 2,9	5,6 5,8	6,7 7,7	1,9 4,0	3,9 4,4

Les valeurs données pour chaque acide aminé correspondent à leurs pourcentages par rapport à leur somme dans les hydrolysats (somme calculée en micromoles (11, 13, 14 et 15) ou en poids (12), ou à leurs pourcentages par rapport à l'azote protéique des échantillons (1 à 10).

Lorsque plusieurs échantillons ont été analysés pour une même catégorie de protéines, les deux nombres superposés et précédés d'un trait indiquent les valeurs inférieures et supérieures qui ont été déterminées.

1, 2, 3, 4, 5 et 6 : d'après YEMM, 1958
7 : d'après THOMPSON et STEWARD, 1952
8 : d'après KNIGHT, 1947
9 : d'après HOFMAN, 1953
10 : d'après FOWDEN, 1954 (7, 8 et 9 sont cités d'après ce dernier auteur)
11 : d'après VILLERET, 1967
12 : d'après JONES et BLINKS, 1957
13, 14 et 15 : résultats personnels

L'acide glutamique et l'acide aspartique sont les constituants prépondérants de ces fractions protéiques diverses. Toutefois, la proline, l'alanine, les leucines, l'arginine, l'histidine, la sérine, la glycine, notamment, peuvent acquérir, une grande importance quantitative dans les hydrolysats de certaines espèces. Ainsi, des compositions très variées peuvent être observées, chaque échantillon ayant ses caractères propres. Cependant, les Algues d'une même origine ont parfois des traits communs. Celles testées par NASR et coll. (1967) se distinguent par la forte teneur en leucines chez pratiquement toutes les espèces, de la phénylalanine et de la valine chez quelques unes. La sérine est absente des hydrolysats de la plupart des Algues examinées par ces auteurs. Les analyses de LEWIS et GONZALVES (1962), de LEWIS (1962-1963), de PELLIGRINI (1968), comme celles du présent travail, mettent en évidence une plus grande importance des acides aminés basiques, principalement de l'arginine.

Remarque. - D'après FOWDEN (1952), les protéines totales de *Chlorella vulgaris, Anabaena cylindrica, Tribonema aequale* et *Navicula pelliculosa* sont probablement des albumines et des globulines. En ce qui concerne les 10 espèces marines analysées ici, la composition en acides aminés de leurs protéines totales ne permet pas de rattacher nettement ces protéines à une catégorie bien déterminée, établie pour les plantes supérieures. L'arginine représente souvent, en effet, une proportion relativement importante des acides aminés des hydrolysats protéiques (Tableau XV), fait que l'on ne retrouve pas chez les Algues marines étudiées. Toutefois, une certaine analogie existe entre la composition en acides aminés des protéines totales des espèces analysées et celle des prolamines, glutélines, albumines et protéines cytoplasmiques. Cette analogie est basée sur l'importance relative de l'arginine, de la proline, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'alanine essentiellement (Tableau XV).

B. - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

La composition azotée des Algues marines des côtes bretonnes est, dans son ensemble, comparable à celle d'échantillons de ces végétaux marins d'autres régions du globe. Toutefois, des différences apparaissent entre les résultats. Elles concernent surtout les acides aminés libres et combinés.

Les amides, asparagine et glutamine, ont été considérées pendant longtemps comme absentes de la fraction aminée soluble des Algues marines (COULSON, 1953 ; JONES, 1956). Différentes raisons peuvent être invoquées pour expliquer ce fait : la fragilité de ces constituants, surtout de la glutamine, leurs très faibles concentrations dans les extraits, et les variations de ces concentrations dans l'échantillon, en fonction de la saison ou de la croissance. Pourtant de faibles quantités d'azote amidé ont pu être dosées chez quelques espèces (CHANNING et YOUNG, 1953). Plus tard, LEWIS et GONZALVES (1959-1962),

LEWIS (1962-1965) et KURIYAMA (1961) ont identifié de l'asparagine libre chez plusieurs Algues, principalement des Chlorophycées et des Rhodophycées. La glutamine a également été retrouvée par SCHWEIGER (1967) chez *Macrocystis pyrifera,* par NASR et coll. (1968) chez *Ulva lactuca, Dictyota dichotoma* et *Pterocladia capillacea* (à l'état de traces) et par LANDSBERGER et coll. (1969) chez *Lessonia nigrescens, Durvillea antarctica* et *Macrocystis integrifolia* (en quantités appréciables). Les amides (la technique de dosage n'a pas permis de séparer la glutamine de l'asparagine) ont pu être dosées dans la fraction aminée libre de nombreuses Chlorophycées, Phéophycées et Rhodophycées analysées dans le présent travail. Elles atteignent chez les Algues vertes des concentrations relativement importantes (environ 40 % de la fraction aminée libre de *Cladophora rupestris*).

Les résultats diffèrent également en ce qui concerne la répartition de la citrulline libre chez les espèces étudiées. Comme pour les Algues marines de Bretagne, LEWIS et GONZALVES (1959-1962), LEWIS (1962-1965), DAIGO (1959), TAKAGI et coll. (1964) et KURIYAMA (1961) ne signalent cet acide aminé que chez des Rhodophycées. KURIYAMA dit même que la citrulline semble être caractéristique des Algues rouges. Pourtant, LANDSBERGER et coll. (1969) l'ont détectée chez *Lessonia nigrescens, Durvillea antarctica* et *Macrocystis integrifolia,* et NASR et coll. (1967) chez *Enteromorpha intestinalis, Ulva lactuca* et *Cystoseira baccata.* Toutefois, les résultats de ces auteurs demandent à être confirmés. Ceux de LANDSBERGER et coll. sont très inconstants : certains acides aminés, la citrulline notamment, sont présents dans les extraits de thalles frais et absents dans ceux des poudres sèches du même échantillon, ou inversement ! Ceux de NASR et coll. ne mettent en évidence que de très faibles quantités de cet acide aminé. De plus, les arguments qu'ils apportent pour conclure à l'existence de cette citrulline ne sont pas tous absolument convaincants. Dans le système de chromato-électrophorèse qu'ils utilisent, la glutamine et la citrulline ne sont pas séparées. Ils s'appuient, en premier lieu, sur l'hypothèse, non vérifiée, de l'absence de glutamine dans leurs échantillons, pour conclure à la présence de citrulline. La confirmation de l'identité de ce composé par cochromatographie ne constitue pas, en l'occurence, une preuve. Toutefois, l'utilisation du réactif d'EHRLICH doit en être une. Mais les auteurs ne précisent pas suffisamment les conditions d'emploi de ce réactif, et il en résulte qu'un certain doute peut subsister.

La présence dans les protéines de certains acides aminés plus rares pour ces végétaux marins : béta-alanine, alpha- et gamma-aminobutyrique, hydroxy-

TABLEAU XVI

Les caractéristiques de la composition azotée des Algues marines bretonnes

CHLOROPHYCEES		PHEOPHYCEES		RHODOPHYCEES	
Nt %	Minimum : 1,05 *(Monostroma grevillei)*	Nt %	Minimum : 0,97 *(Chorda filum)*	Nt %	Minimum : 1,68 *(Bornetia secundiflora)*
	Moyenne : 3,68		Moyenne : 2,77		Moyenne : 4,12
	Maximum : 5,98 *(Cladophora rupestris)*		Maximum : 4,05 *(Laminaria saccharina)*		Maximum : 6,89 *(Porphyra umbilicalis)*
Ns % Nt	Minimum : 12,0 *(Codium fragile) (Codium bursa)*	Ns % Nt	Minimum : 9,0 *(Dictyopteris) membranacea)*	Ns % Nt	Minimum : 13,0 *(Grateloupia filicina)*
	Moyenne : 23,0		Moyenne : 23,6		Moyenne : 27,0
	Maximum : 29,0 *(Ulva lactuca) (Enteromorpha intest.)*		Maximum : 38,0 *(Halidrys siliquosa)*		Maximum : 55,0 *(Laurencia obtusa)*
NNO_3	Minimum : 0,06 *(Codium bursa)*	NNO_3	Minimum : 0,02 *(Chorda filum)*	NNO_3	Minimum : 0,02 *(Grateloupia filicina) (Gigartina pistillata)*
	Moyenne : 0,29		Moyenne : 0,15		Moyenne : 0,32
	Maximum : 0,55 *(Cladophora pellucida)*		Maximum : 0,37 *(Fucus serratus)*		Maximum : 0,70 *(Porphyra umbilicalis)*
Acides aminés libres prépondérants	Amides : 5 espèces / 10 Ac. glut. : 3 espèces / 10 Alanine : 1 espèce / 10 Proline : 1 espèce / 10	Acides aminés libres prépondérants	Alanine : 14 espèces / 25 Ac. glut. : 9 espèces / 25 Amides : 2 espèces / 25	Acides aminés libres prépon-dérants	Citrul. : 7 espèces / 37 Proline : 7 espèces / 37 Ac. glut. : 18 espèces / 37 Alanine : 2 espèces / 37 Lysine : 1 espèce / 37 Histidine : 1 espèce / 37 Méthion. : 1 espèce / 37

Nt et NNO_3 sont exprimés en pourcentages du poids sec.

proline, homocystine, ornithine, citrulline, est signalée de plus en plus souvent. Toutefois, cette présence n'est pas établie de façon définitive, les auteurs reconnaissant que les techniques analytiques peuvent être responsables de leur formation dans les hydrolysats. Ainsi, l'homocystine peut provenir d'une destruction de la méthionine (hydrolyse en présence de glucides), l'ornithine de celle de l'arginine pendant l'hydrolyse ou l'électrolyse, la béta-alanine et l'acide gamma-aminobutyrique d'une décarboxylation des acides aspartique et glutamique respectivement, pendant la préparation du matériel (LEWIS et GONZALVES, 1962 ; NASR et coll., 1967). SMITH et YOUNG (1955) ont noté la présence d'ornithine et de citrulline dans les hydrolysats acides du résidu d'extraction alcoolique de *Chondrus crispus.* Ils ne pensent pas que ces acides puissent provenir d'une destruction de l'arginine dans les conditions expérimentales. En effet, en ajoutant ce dernier composé dans leurs milieux d'hydrolyse, ils n'observent pas d'augmentation des concentrations de l'ornithine ni de la citrulline dans les hydrolysats. Ils pensent que ces acides pourraient provenir de peptides que l'alcool n'aurait pas extraits ou d'une action enzymatique agissant sur l'arginine lors de la préparation du matériel. SERENKOV et PAKHOMOVA (1961) ont également signalé de la citrulline dans les hydrolysats de *Dunaliella salina,* et VILLERET (1966) dans ceux de *Sacheria fluviatilis* et de *Lemanea nodosa.* Ce dernier auteur a aussi détecté de l'ornithine chez les deux espèces précédentes ainsi que chez une troisième, *Batrachospermum sp.* Les acides aminés basiques, d'une manière générale, sont bien représentés dans les hydrolysats de ces trois Rhodophycées d'eau douce. L'auteur pense qu'ils résultent probablement d'une hydrolyse de peptides précipitant par l'alcool ou l'acide trichloracétique.

Les résultats obtenus dans le présent travail portent sur un nombre relativement élevé d'espèces (72), ce qui permet d'obtenir une image assez précise de la composition azotée des Algues marines des côtes bretonnes. Les précautions prises au moment de l'échantillonnage rendent possible la comparaison des valeurs acquises pour les différents échantillons. Ces valeurs sont représentatives des espèces étudiées, dans les conditions définies précédemment.

En résumé, *les principaux caractères de cette composition azotée des Algues marines bretonnes sont les suivants :*

Les plus faibles pourcentages d'**azote total** ont été trouvés chez les Phéophycées, et les plus forts chez les Rhodophycées (Tableau XVI). Les Chlorophycées présentent une valeur intermédiaire. **Les composés azotés solubles** constituent, en moyenne, une plus grande partie de la fraction azotée totale des

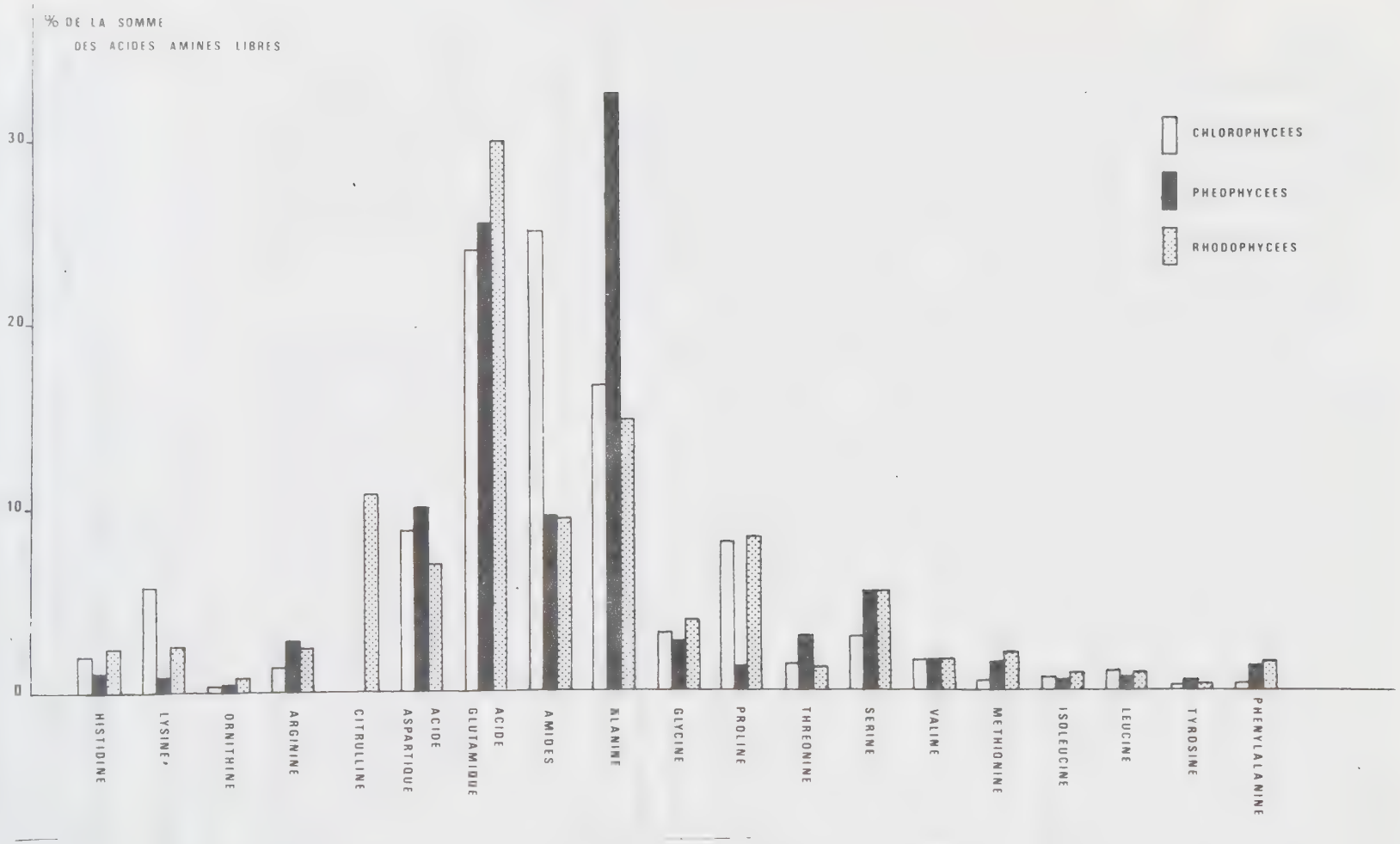


Fig. 20 - Composition moyenne en acides aminés libres des Algues marines étudiées. (Moyenne des résultats obtenus pour 10 Chlorophycées, 25 Phéophycées et 37 Rhodophycées). La valeur obtenue pour chaque acide aminé est exprimée en pourcentage de la somme moyenne (en micromoles) des acides aminés libres de chaque classe.

Algues rouges que de celles des Algues vertes et brunes, chez lesquelles ces composés ont une importance équivalente (Tableau XVI).

L'**azote minéral,** comme chez les plantes supérieures, est, quantitativement, très peu représenté chez les espèces étudiées. Toutefois, l'azote nitrique peut atteindre des pourcentages relativement élevés (Tableau XVI). Ceux des Chlorophycées et des Rhodophycées sont, en moyenne, les plus forts, et du même ordre de grandeur pour ces deux classes. Ceux des Phéophycées sont nettement inférieurs. Mais certaines Algues brunes (Tableau V) possèdent des concentrations plus importantes.

En ce qui concerne **la composition en acides aminés libres,** si la prépondérance de l'acide glutamique et de l'alanine est nette pour l'ensemble des Algues des côtes bretonnes, des différences apparaissent d'une classe à l'autre. Chez les Chlorophycées, l'importance quantitative des amides et de l'acide glutamique est manifeste. Chez les Phéophycées, ce sont l'alanine et l'acide glutamique qui dominent, et chez les Rhodophycées, l'acide glutamique, la citrulline et la proline. Les trois classes d'Algues marines macroscopiques sont donc bien caractérisées à cet égard. Cette caractérisation, basée sur l'analyse de 37 Rhodophycées, 25 Phéophycées et 10 Chlorophycées, peut paraître moins bonne pour cette dernière classe. Il faut toutefois remarquer que les représentants de ce groupe sont assez peu nombreux, et que les principaux d'entre eux ont été analysés.

Au niveau des subdivisions de chaque classe, principalement pour les ordres et familles, le nombre d'espèces étudiées est souvent trop faible, surtout chez les Rhodophycées, pour que les résultats obtenus en fournissent une caractérisation suffisante. Malgré tout, certains groupes se distinguent aisément : Les Iso- et Hétéro-généralées d'une part (prépondérance de l'alanine) et les Cyclosporées d'autre part (prépondérance de l'acide glutamique). De même, l'ordre des Gigartinales se différencie par ses nombreuses espèces qui possèdent une forte concentration de citrulline libre.

Chaque espèce possède une composition particulière en acides aminés libres. Le seul examen des acides aminés prépondérants permet en général une bonne distinction de chacune d'elles. Cette distinction est très facile lorsque le pool des acides aminés libres d'une Algue, ou d'un nombre limité d'entre elles, est dominé par un acide particulier, la citrulline, la proline, la méthionine ou la lysine par exemple. A ce sujet, des différences sont intéressantes à noter à

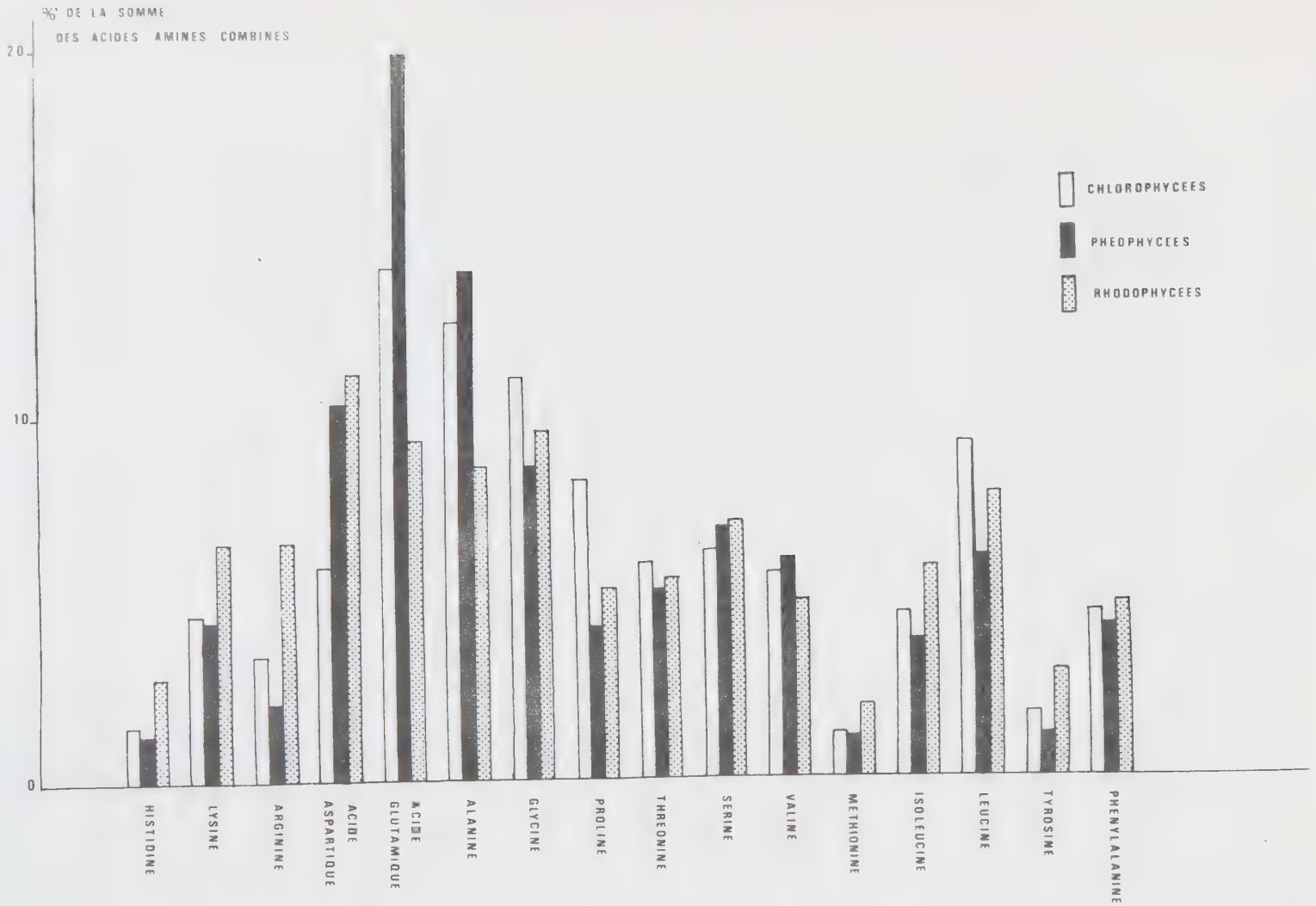


Fig. 21 - Composition moyenne en acides aminés combinés de quelques espèces d'Algues marines des côtes Bretonnes. (Moyenne des valeurs obtenues pour 3 Chlorophycées, 5 Phéophycées et 2 Rhodophycées). La valeur obtenue pour chaque acide aminé est exprimée en pourcentage de la somme moyenne (en micromoles) des acides aminés combinés de chaque classe

l'intérieur d'un même genre. Ainsi, *Polysiphonia elongata* et *P. nigrescens* présentent de fortes concentrations de proline libre, alors que chez *P. lanosa,* c'est la citrulline qui est prépondérante. De même, *Gigartina stellata* (citrulline) se distingue nettement des deux autres espèces du genre analysées dans cette étude (acide glutamique). Mais cette distinction est également possible lorsque la prépondérance est marquée par un acide aminé plus courant, tel l'acide glutamique ou l'alanine, l'importance relative de cet acide et des deux ou trois autres qui sont quantitativement les plus importants dans la fraction aminée libre permettant d'obtenir une image caractéristique de l'espèce.

Que vaut cette caractérisation ? Les acides aminés libres sont des métabolites susceptibles de présenter des variations quantitatives continuelles en fonction de l'état physiologique de la plante. Il semble toutefois, pour certaines des Algues étudiées tout au moins, que le pool des acides aminés libres conserve une stabilité qualitative remarquable. Des analyses multiples de la fraction aminée libre de *Polysiphonia lanosa* m'ont montré que la citrulline en constituait toujours l'élément dominant. Il en est de même pour d'autres espèces, chez lesquelles cette dominance est marquée par l'alanine ou l'acide glutamique. Cela peut être vérifié en fonction de différentes parties du thalle (*Enteromorpha intestinalis* et *Himanthalia elongata,* Tableaux X et XI), de plusieurs stades de développement (*Fucus spiralis,* Tableau XII), ou à des époques variées de l'année (*Polysiphonia lanosa,* Tableau XIII). Ces premiers résultats nécessiteront une vérification ultérieure. Quoi qu'il en soit, les données obtenues restent valables et comparables dans les conditions d'échantillonnage définies au début de ce mémoire.

Les quelques renseignements acquis sur **la composition en acides aminés des protéines** des Algues marines des côtes bretonnes ne peuvent fournir qu'une indication sommaire sur cette composition. Bien qu'une certaine homogénéité puisse être observée entre les différents groupes et espèces, chaque Algue conserve son individualité. Une faible différenciation peut toutefois être établie entre les Chlorophycées, les Phéophycées et les Rhodophycées, d'après l'importance respective des acides aminés basiques, de l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'alanine, la glycine et la proline notamment. Mais tous les acides aminés présents dans ces hydrolysats sont d'origines diverses, puisqu'ils proviennent de poudres végétales dont seuls les composés solubles ont été extraits. L'étude des protéines individuelles séparées, il en existe probablement qui sont spécifiques (FOWDEN, 1962), sera certainement une source de données plus intéressantes.

Cette étude montre que la plupart des fractions azotées analysées ne peuvent apporter une bonne différenciation des Algues étudiées. C'est le cas des composés ammoniacaux, nitreux, nitriques et azotés totaux en particulier. Toutefois, pour certaines espèces, les valeurs obtenues sont très différentes des moyennes calculées. Quelques Algues présentent ainsi des pourcentages de nitrates relativement forts : *Cladophora pellucida, Fucus serratus* et *Porphyra umbilicalis* par exemple.. D'autres possèdent des valeurs remarquables d'azote total : *Porphyra umbilicalis* (la plus élevée de toutes les espèces analysées : 6,9 ‰) et *Chorda filum* (la plus faible : 1,0 ‰). Les chiffres moyens, pour chacune des trois classes étudiées, semblent significatifs et permettent de les distinguer les unes des autres : Chlorophycées, 3,7 ‰ , Phéophycées, 2,8 ‰ et Rhodophycées, 4,1 ‰ . **Par contre, la composition en acides aminés libres, beaucoup plus diversifiée, permet une différenciation des trois classes, de certains groupes, et des espèces, certaines d'entre elles ayant une composition bien particulière. Cette différenciation ne vaut, il est nécessaire d'insister sur ce point, que dans les conditions qui ont été retenues pour cette étude.**

L'existence de ces compositions particulières pose aussi le problème du métabolisme de quelques composés chez ces végétaux, métabolisme qui semble présenter parfois des modalités spéciales. Ces modalités diffèrent-elles de celles qui ont été établies pour d'autres plantes ? Sont-elles les mêmes pour toutes les espèces d'Algues qui présentent des traits communs dans leur composition, par exemple une accumulation de citrulline ? Pour tenter d'apporter une réponse à cette dernière question, l'étude du métabolisme de la citrulline a été entreprise chez une Rhodophycée Céramiale, *Polysiphonia lanosa.*

DEUXIEME PARTIE

LE METABOLISME DE LA CITRULLINE

chez *Polysiphonia lanosa*

CHAPITRE I

LA SYNTHESE DE LA CITRULLINE

A.- ABSORPTION D'ORNITHINE ET D'ARGININE

1. - Maintien de *Polysiphonia lanosa* en milieu non renouvelé
2. - Absorption d'ornithine et d'arginine

B.- ABSORPTION D'ORNITHINE RADIOACTIVE

1. - Protocole expérimental
2. - Résultats et commentaires

C.- ETUDE ENZYMATIQUE

1. - Les difficultés de l'étude enzymatique
2. - Essai d'isolement des protéines enzymatiques
3. - Etude des enzymes
4. - Résultats et commentaires

CHAPITRE II

DEGRADATION DE LA CITRULLINE

A.- ABSORPTION DE CITRULLINE MARQUEE

1. - Protocole expérimental
2. - Résultats et commentaires

B.- ETUDE ENZYMATIQUE

1. - Etude des enzymes

a. - L'arginine synthétase

b. - La citrullinase

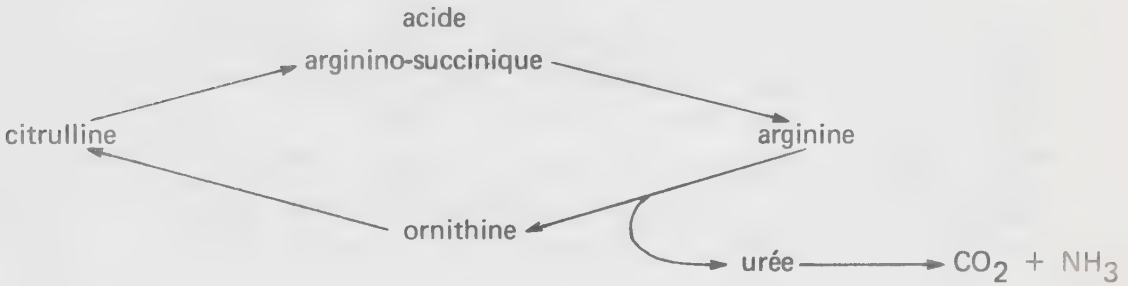
c. - Les transaminases

2. - Résultats

C O N C L U S I O N S

INTRODUCTION

A la suite des travaux de KREBS et HENSELEIT (1932), qui avaient émis l'hypothèse que l'ornithine et la citrulline interviennent dans la synthèse de l'arginine, le métabolisme de la citrulline est envisagé, le plus souvent, dans le cadre du cycle de l'ornithine



Ce cycle a pu être mis en évidence chez les animaux (RATNER, 1954), les microorganismes (SRB et HOROWITZ, 1944) et quelques plantes supérieures (chez la Pastèque : KASTING et DELWICHE, 1958 ; chez *Pinus pinea* : GUITTON, 1964, par exemple). Mais la plupart des travaux qui lui ont été consacrés n'ont pu démontrer, chez ces derniers végétaux, le fonctionnement complet du cycle (BARNES et NAYLOR, 1961, chez *Pinus palustris* et *Pinus elliottii* ; DURANTON, 1959, dans les tissus de Topinambour cultivés ; TOUZE, 1964, chez le Melon ; ...).

Des recherches, entreprises chez les Algues d'eau douce, ont permis de montrer que le cycle de l'ornithine est probablement actif chez certaines espèces, mais qu 'il peut présenter des modalités différentes de l'une à l'autre. Chez *Chlorella pyrenoidosa,* par exemple, organisme dépourvu d'uréase et d'arginase, mais qui est capable de synthétiser de l'acide arginino-succinique à partir de l'arginine et du fumarate, et qui possède une arginine-désimidase active, le cycle se déroulerait dans le sens inverse de celui donné par KREBS et HENSELEIT (WALKER, 1952 ; WALKER et MYERS, 1953 ; HATTORI, 1958). Mais chez *Chlorella vulgaris,* BAKER et THOMPSON (1962) pensent que le métabolisme de l'ornithine peut s'expliquer dans le cadre du cycle classique, bien que cette espèce ne présente pas davantage d'activité uréasique que la précé-

dente (HODSON et THOMPSON, 1969). Chez *Nostoc muscorum,* HOLM-HANSEN et BROWN (1963) ont pu mettre en évidence la synthèse de citrulline à partir de bicarbonate, d'ATP et d'ammoniaque, mais ils n'ont pu obtenir expérimentalement le passage de la citrulline à l'arginine.

Chez les Algues marines REUTER (1961) a décelé la présence d'ornithine transcarbamylase chez quatre espèces méditerranéennes : *Cladophora prolifera* et *Ulva lactuca* (Chlorophycées), *Neomonospora furcellata* et *Gracilaria confervoides* (Rhodophycées).

Parallèlement à ces recherches qui se rapportent au cycle de KREBS et HENSELEIT, d'autres travaux ont montré que la citrulline est l'un des premiers acides aminés marqués lorsque le $^{14}CO_2$ est assimilé dans les processus photosynthétiques, chez *Nostoc muscorum* (LINKO et coll., 1957) et chez *Ulva lactuca* (PATIL et JOSHI, 1970). Chez les plantes supérieures, il semble que les acides aminés du cycle de l'ornithine puissent également jouer un rôle dans les phénomènes de croissance, de dormance et de sénescence (NAYLOR, 1959).

La citrulline, comme l'ornithine, ne sont pas des constituants habituels des protéines végétales. On pense généralement que ces acides aminés ne sont que des intermédiaires dans la synthèse protéique. La citrulline peut, en effet, se transformer en arginine ou en ornithine, et ce dernier en arginine, en acide glutamique ou en proline. L'arginine, l'acide glutamique et la proline sont, eux, des constituants normaux des protéines.

Il est parfois possible de constater une accumulation de l'un des acides aminés du cycle de KREBS et HENSELEIT chez certains végétaux. Cette accumulation peut être en relation avec une déficience minérale, principalement en soufre, potassium, cobalt ou fer (CRANE, 1951-1962 ; COLEMAN, 1957-1958 ; HOLLEY et CAIN, 1955 ; ...). Elle traduit une modification du métabolisme azoté, la synthèse des protéines paraissant perturbée. Mais cette accumulation peut aussi correspondre à une forme de réserve azotée (LEAF et coll., 1958 ; MIETTINEN et VIRTANEN, 1952).

Ces deux faits : modification du métabolisme ou forme de réserve azotée pouvaient être invoqués pour expliquer la forte concentration de citrulline libre observée chez certaines Rhodophycées. Il importait donc de vérifier si le métabolisme de cet acide aminé avait lieu normalement chez ces Algues, dans

le cadre du cycle de l'ornithine, ou si le déroulement de ce cycle était entravé, par exemple par une déficience enzymatique.

Cette première étude a été consacrée à *Polysiphonia lanosa*, une Céramiale qui vit en épiphyte sur *Ascophyllum nodosum,* et qui peut être récoltée en abondance pratiquement toute l'année.

J'ai d'abord recherché comment se faisait la synthèse de la citrulline chez la plante, en lui faisant absorber des acides aminés susceptibles de favoriser l'élaboration de cette molécule. Pour compléter et préciser ces résultats, j'ai fourni à ce Thallophyte de l'ornithine dont la molécule était marquée par un atome de carbone radioactif, puis j'ai essayé de mettre en évidence les enzymes impliquées dans les séquences métaboliques suggérées par les études précédentes.

Il fallait ensuite savoir si la citrulline accumulée par l'Algue était réutilisée, et comment. Dans ce but, j'ai fait absorber de la citrulline radioactive à *Polysiphonia lanosa,* pour en suivre les transformations au sein de la fraction aminée libre. Il a été nécessaire, alors, de rechercher les enzymes pour tenter de confirmer les voies métaboliques que les premiers résultats semblaient indiquer.

TABLEAU XVII

Les acides aminés des peptides de la fraction azotée soluble de Polysiphonia lanosa (*24.1.1966*)

	Acides aminés dans l'hydrolysat (µM pour 1 g sec)	Acides aminés des peptides (µM pour 1 g sec)	Pourcentages
Histidine	3,4	1,6	1,7
Lysine	10,0	3,9	4,3
Ornithine	83,5	-	-
Arginine	8,8	4,3	4,7
Citrulline	189,4	-	-
Acide aspartique	24,0	7,7	8,5
Acide glutamique	45,0	24,1	26,7
Alanine	12,1	6,1	6,7
Glycine	24,3	18,8	20,9
Proline	66,2	-	-
Thréonine	13,0	13,0	14,4
Sérine	7,5	2,2	2,4
Valine	4,0	1,8	2,0
Méthionine	+		
Isoleucine	4,0	2,5	2,7
Leucine	5,5	4,0	4,4
Tyrosine	0,7		
Phénylalanine	10,1		
T O T A U X	511,5	90,0	

Hydrolyse par HCl 6 N, à 100°C pendant 12 heures, d'une fraction aliquote de l'extrait "Azote soluble". Une partie de la somme des acides aspartique et glutamique (14 µM) provient de l'hydrolyse des amides. De même, l'ornithine apparue dans l'hydrolysat a pour origine la destruction partielle de la citrulline dans les conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en micromoles d'acides aminés, pour un gramme de poids sec, et en pourcentage de chaque aminoacide par rapport à leur somme.

PREMIER CHAPITRE

LA SYNTHESE DE LA CITRULLINE

Il importe de rappeler tout d'abord les traits dominants de la composition azotée de *Polysiphonia lanosa* (voir les tableaux VI, IX, XIV, XVII et la Fig. 19).

La fraction azotée totale de l'Algue représente une partie relativement élevée du poids sec : 5,6 ‰ . La majorité des composés azotés existe sous forme insoluble : 61 ‰ . Leur hydrolyse acide (Tableau XIV) libère des acides aminés parmi lesquels l'acide aspartique, la glycine, l'acide glutamique, l'alanine et la leucine sont quantitativement les plus importants. L'ornithine et la citrulline sont absentes dans cet hydrolysat.

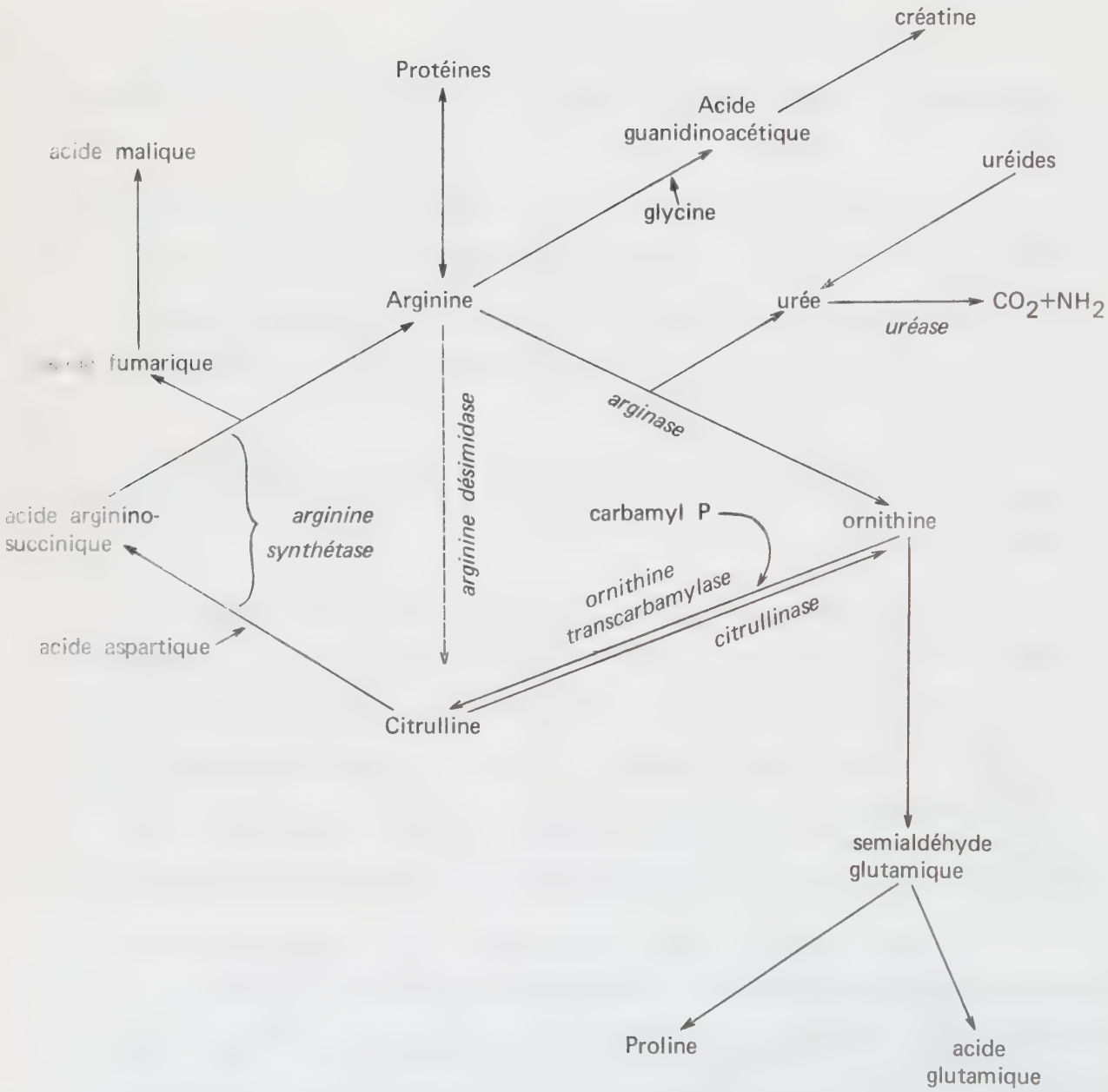
Les constituants solubles (39 ‰ de Nt) sont essentiellement des nitrates (9,2 ‰ de Ns), des peptides (7,0 ‰ de Ns) et des acides aminés libres (70,2 ‰ de Ns).

L'hydrolyse acide d'une partie aliquote de la fraction azotée soluble (Tableau XVII) fait apparaître un certain nombre d'acides aminés, qui proviennent surtout de peptides de faibles poids moléculaires, que l'acide trichloracétique n'a pas précipités lors de l'extraction des composés azotés solubles. L'acide glutamique, la glycine, la thréonine, l'acide aspartique y sont les aminoacides quantitativement les mieux représentés. L'ornithine, la citrulline, la méthionine, la tyrosine et la phénylalanine n'y sont pas détectées (l'ornithine dosée dans l'hydrolysat provient d'une destruction partielle de la citrulline dans les conditions expérimentales).

Dans la fraction aminée soluble (Tableau IX), la méthionine, la thréonine, l'ornithine, n'existent qu'en très faibles concentrations. De même, les proportions d'acide aspartique, d'acide glutamique, d'alanine et de proline (3,9, 4,9, 1,4 et 15,6 ‰ de la fraction aminée libre, respectivement) sont réduites comparées à celle de la citrulline (62,3 ‰) qui en constitue l'élément prépondérant (Fig. 19).

TABLEAU XVIII

Les principales voies métaboliques connues qui se rapportent aux acides aminés du cycle de l'ornithine



La synthèse de la citrulline peut être envisagée (Tableau XVIII) :

- **à partir de l'arginine :**

  a. - par hydrolyse de l'arginine en citrulline et ammoniac (RATNER, 1954 ; OGINSKY, 1955).

  b. - par la voie inverse de la conversion citrulline-arginine, passant par l'intermédiaire de l'acide arginino-succinique (NAYLOR, 1959).

- **à partir de l'ornithine,** suivant la voie la plus fréquemment rencontrée, faisant intervenir le carbamylphosphate. Ce dernier composé peut être synthétisé, en présence d'ions Mg^{++}, à partir de l'ATP, de bicarbonate et d'ammoniaque. L'azote ammoniacal peut être d'origine minérale (NH_4Cl) ou organique (acide glutamique, acide acétylglutamique, glutamine : RATNER, 1955 ; LEVENBERG, 1962 ; BARET et coll., 1965). Mais le carbamylphosphate peut également dériver de l'acide allantoïque par l'intermédiaire de l'acide oxalurique. Ce dernier, en présence d'acide phosphorique, donne de l'acide oxamique et de l'acide carbamylphosphorique (VOGELS, 1963).

A. - ABSORPTION D'ORNITHINE ET D'ARGININE

La culture pure des Algues marines au laboratoire pose encore des problèmes délicats. De plus, la croissance obtenue dans ces conditions est très lente, ce qui est incompatible avec la plupart des expériences de Physiologie végétale. L'utilisation de cette technique n'a donc pas été retenue pour essayer de résoudre les problèmes posés par *Polysiphonia lanosa.* Par contre, il semblait possible de mettre l'Algue en présence de certains acides aminés pendant un temps court, mais suffisant pour qu'ils puissent être utilisés et que cette utilisation se répercute sur la composition de la plante. C'est dans ce but que j'ai voulu faire absorber de l'ornithine et de l'arginine par la Céramiale.

Le fait de détacher les Algues de leur support, *Ascophyllum nodosum,* et de les maintenir quelques heures dans un milieu non renouvelé, pouvait entraîner chez elles, dans ces conditions, des modifications physiologiques et biochimiques. Afin de connaître l'importance de ces modifications, une expérience de contrôle a été effectuée.

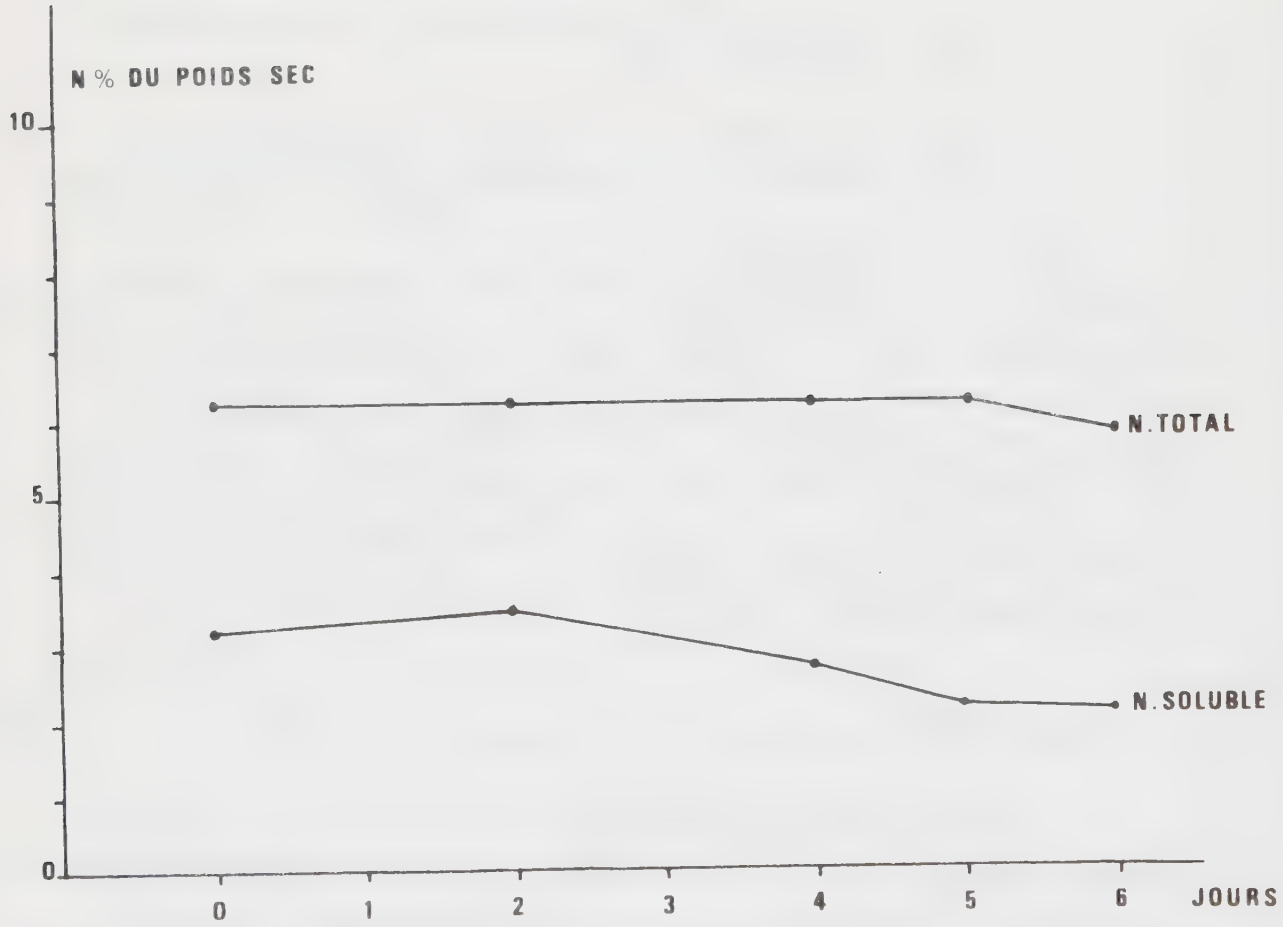


Fig. 22.- Evolution des pourcentages de l'azote total et de l'azote soluble (sur la base du poids sec), chez *Polysiphonia lanosa* maintenue en milieu confiné pendant six jours.

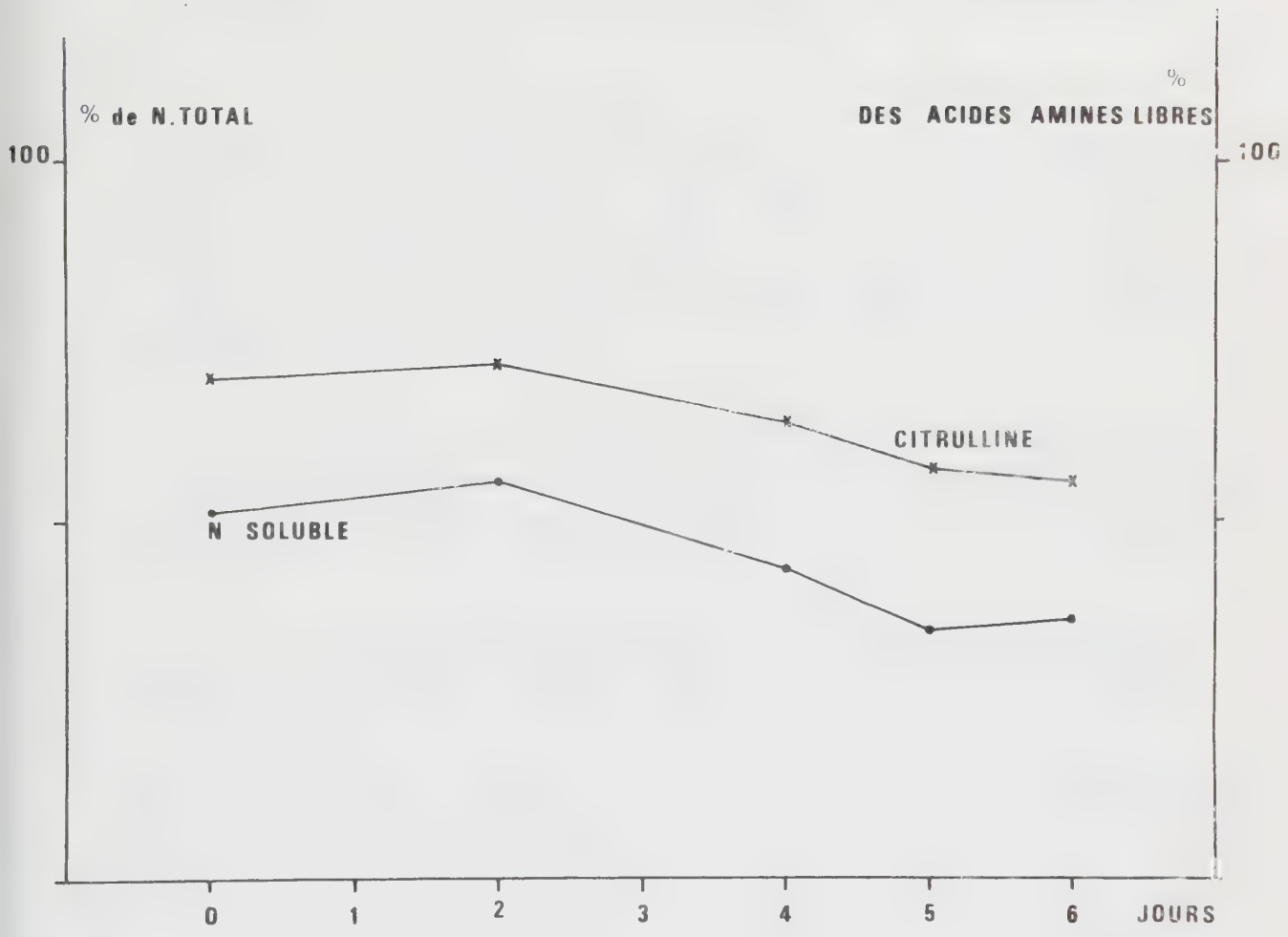


Fig. 23.- Evolution des valeurs de la fraction azotée soluble, en pourcentages de la fraction azotée totale, et de la citrulline libre, en pourcentages de la somme des acides aminés libres, chez *Polysiphonia lanosa* maintenue en milieu confiné pendant six jours.

1. - Maintien de *Polysiphonia lanosa* en milieu non renouvelé

Des erlenmeyers d'un litre, bouchés par un tampon de coton cardé, sont stérilisés. On y verse 500 ml d'eau de mer, filtrée sur filtres millipores (Diamètre 45 mm ; porosité 0,45 µ) puis tyndalisée.

Les Algues qui viennent d'être récoltées sont séparées d'*Ascophyllum nodosum,* nettoyées soigneusement à l'eau de mer, puis à l'eau de mer stérile, plusieurs fois consécutives. Après un essorage rapide, on en pèse 15 g environ (plus de 100 individus) que l'on met dans de l'eau de mer stérile, puis dans les erlenmeyers. Toutes ces manipulations se font en évitant au maximum les risques de contamination, bien qu'il n'ait pas été possible d'obtenir une décontamination complète du végétal.

L'échantillon A (le témoin) est immédiatement rincé à l'eau déminéralisée, plusieurs fois consécutives, essoré, puis desséché sur chlorure de calcium sous vide. Les échantillons 1, 2, 3, et 4 sont fixés de la même façon, après 2, 4, 5 et 6 jours respectivement.

Après broyage et homogénéisation, les poudres obtenues sont analysées pour déterminer les valeurs de leurs fractions azote total, azote soluble et acides aminés libres.

Résultats et discussion : Les résultats obtenus sont représentés graphiquement (Fig. 22, 23, 24, 25).

Les pourcentages d'azote total restent constants (6,2 ‰) pendant les cinq premiers jours. Ils subissent une légère baisse (5,8 ‰) à partir du sixième jour.

La fraction azotée soluble, par contre, accuse des variations marquées. Après une légère augmentation au début de l'expérience (de 51,1 à 55,6 ‰ de l'azote total, pendant les deux premiers jours) les pourcentages des composés azotés solubles diminuent régulièrement jusqu'au sixième jour (de 55,6 à 35,6‰).

La fraction aminée libre présente une évolution parallèle à celle de l'azote soluble. La citrulline libre subit une variation identique. Les concentrations de l'ornithine et de l'acide aspartique augmentent un peu au cours de

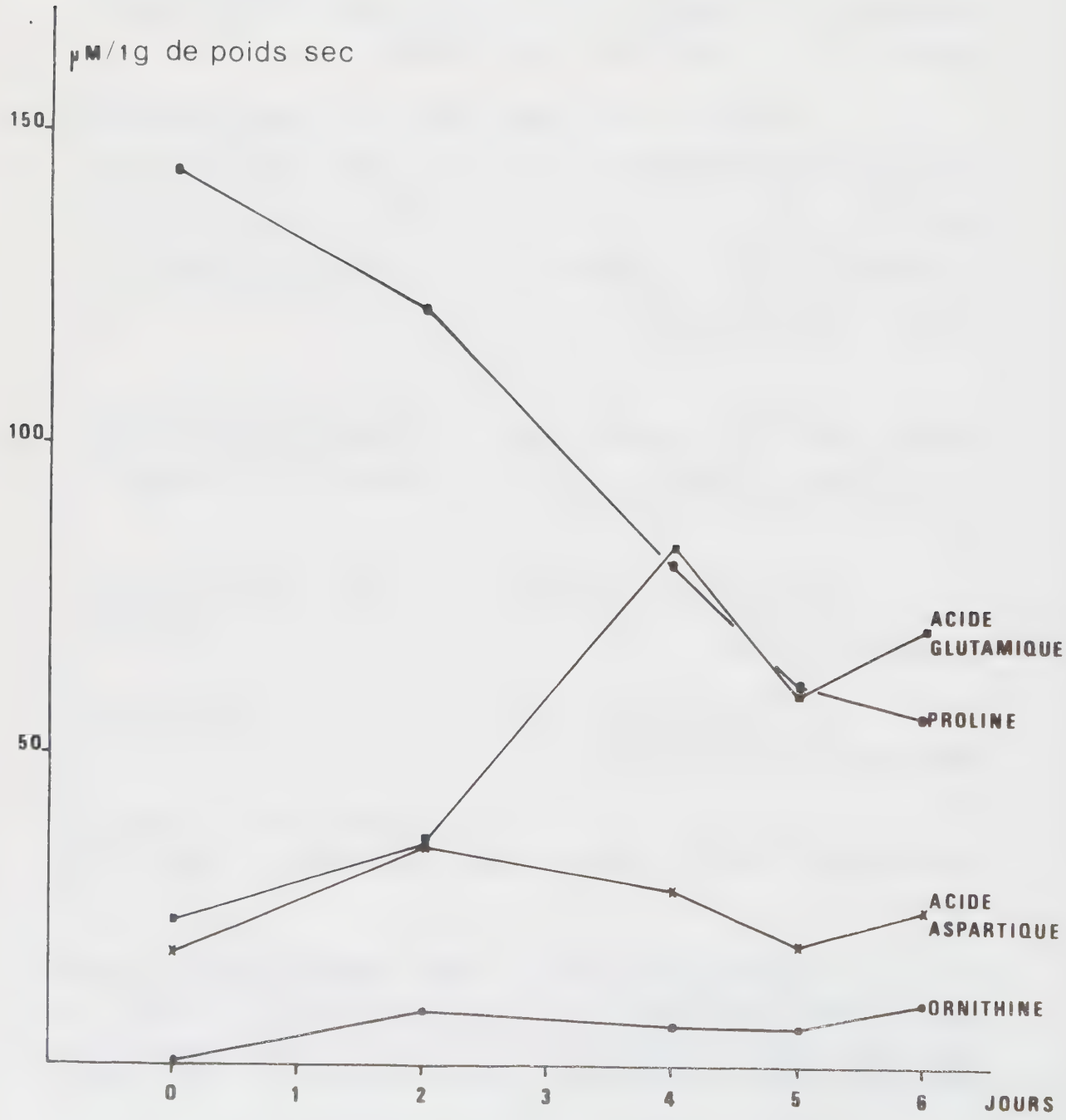


Fig. 24.- Evolution des valeurs des concentrations de différents acides aminés libres, en micromoles par gramme de poids sec, chez *Polysiphonia lanosa* maintenue en milieu confiné pendant six jours.

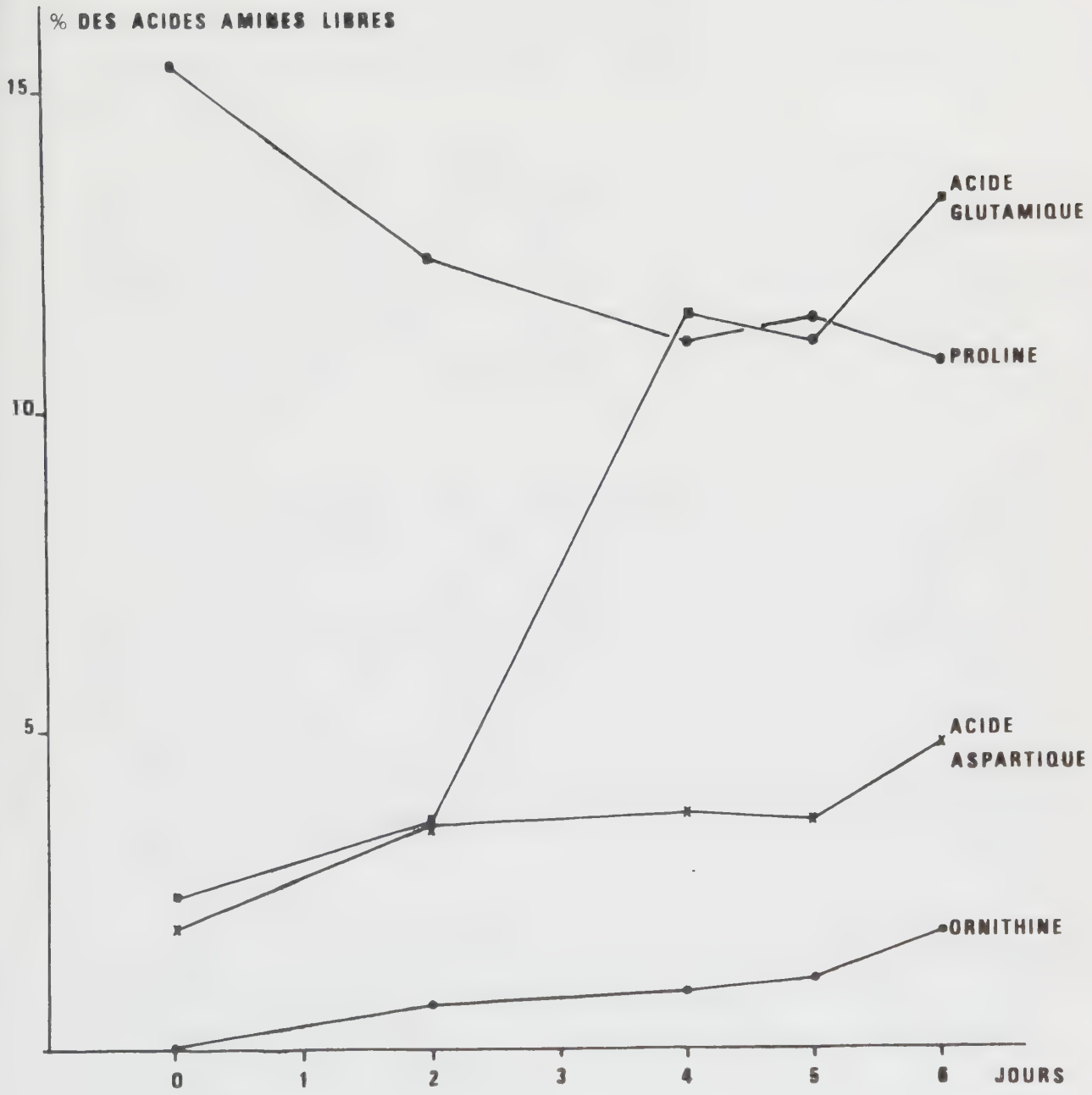


Fig. 25.- Evolution des concentrations de différents acides aminés libres, en pourcentages de la somme des acides aminés solubles chez *Polysiphonia lanosa* maintenue en milieu confiné pendant six jours.

l'expérience, et celle de l'acide glutamique très nettement. Au contraire, la teneur en proline diminue régulièrement. La somme des augmentations des pourcentages de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'ornithine (20,5 °/₀) correspond sensiblement à la diminution de ceux de la citrulline et de la proline (18,9 °/₀).

La baisse des pourcentages de l'azote soluble entre le deuxième et le cinquième jour (1,4 °/₀ du poids sec) ne peut correspondre à une exsorption de substances azotées dans le milieu puisque les taux d'azote total demeurent constant pendant ce temps. Il n'y a pas, en particulier, de pertes de citrulline à partir des Algues. Le dosage de cet acide aminé dans l'eau de mer montre qu'elle n'en contient que des traces, qui proviennent des cellules lésées lors de la préparation du matériel végétal.

Conclusions : Lorsque *Polysiphonia lanosa* se trouve dans des conditions différentes de celles du milieu naturel (eau de mer non renouvelée, dont les substances nutritives, en raison de la grande quantité d'Algues présentes dans un volume restreint, sont rapidement épuisées) la composition azotée totale de la Céramiale ne subit aucune modification pendant les cinq premiers jours. Pendant cette période, l'Algue conserve une apparence morphologique, en particulier une turgescence, tout à fait normale. Mais à partir du septième jour, la phycoérythrine commence à diffuser dans l'eau de mer, et traduit un début de dégénérescence du végétal. Toutes les expériences entreprises dans ce travail ne durant que quelques heures (24 heures au maximum), elles ont eu lieu sur des individus bien vivants.

Au cours des premières 48 heures, la fraction azotée soluble ne varie pratiquement pas. Par contre, des changements importants se produisent ensuite, jusqu'à la fin de l'expérience, dans les fractions soluble et aminée libre. En ce qui concerne ces derniers, on peut se demander s'il n'existe pas une relation métabolique entre les acides aminés libres dont les concentrations diminuent le plus (citrulline et proline) et ceux dont les teneurs augmentent (acide glutamique, acide aspartique et ornithine notamment).

TABLEAU XIX

Variations des teneurs en acides aminés libres des échantillons de Polysiphonia lanosa *(4.4.1966) après absorption d'ornithine et d'arginine (en µM par gramme d'Algues sèches)*

	Témoin dans l'eau de mer pure	Essais dans l'eau de mer enrichie			
		en ornithine (5 µM par ml)		en arginine (5 µM par ml)	
	µM/1 g sec	µM/1 g sec	Différence	µM/1 g sec	Différence
Ornithine	0,5	20,2	+ 19,7	2,0	+ 1,5
Arginine	1,0	0,6	− 0,4	4,0	+ 3,0
Citrulline	284,4	338,1	+ 53,7	299,7	+ 15,3
Acide aspartique	8,4	10,3	+ 1,9	11,1	+ 2,7
Acide glutamique	10,8	20,6	+ 9,8	18,9	+ 8,1
Alanine	12,0	22,0	+ 10,0	22,2	+ 10,2
Proline	72,5	77,6	+ 5,1	73,6	+ 1,1
Acides aminés libres totaux	430,1	532,0	+ 101,9	469,8	+ 39,7

2. - Absorption d'ornithine et d'arginine

Les Algues et le milieu sont préparés dans les mêmes conditions que celles qui viennent d'être décrites dans l'expérience précédente. Trois échantillons identiques sont ainsi constitués, un témoin et deux essais. Chacun d'eux est placé dans 400 ml d'eau de mer stérile. Les erlenmeyers, préparés en fin d'après midi, sont alors abandonnés toute la nuit. Le lendemain matin, on ajoute 100 ml d'eau de mer stérile au témoin et, aux deux essais, une quantité équivalente du même liquide, contenant soit de l'ornithine, soit de l'arginine, à la concentration de 5 micromoles par millilitre.

Après 5 heures à l'obscurité, à la température ordinaire (18°C), les Algues sont prélevées, essorées, rincées plusieurs fois à l'eau de mer stérile, puis à l'eau déminéralisée, et desséchées dans l'étude à vide, en présence de chlorure de calcium anhydre. Après dessiccation, les végétaux sont broyés et les valeurs de la fraction aminée libre sont déterminées pour les poudres des trois échantillons.

Résultats et discussion : Les résultats des dosages sont consignés dans le Tableau XIX.

Il est certain que, malgré les précautions prises, le milieu n'est pas entièrement dépourvu de Bactéries, puisque les Algues n'ont pu être complètement décontaminées. Toutefois l'infection est limitée, et l'action des microorganismes s'est manifestée préférentiellement sur les acides aminés introduits dans le milieu, l'ornithine ou l'arginine, ceux-ci pouvant leur servir de substances nutritives. De plus, les Bactéries qui ont pu se développer sont présentes, en grande majorité, dans l'eau de mer. Elles sont donc éliminées en fin d'expérience par les rinçages successifs. J'admettrai donc que la contamination par les Bactéries est faible, et qu'elle ne retentit pas de façon sensible sur la composition azotée de l'Algue.

Lorsque l'on fournit de l'arginine à *Polysiphonia lanosa,* la concentration de cet acide aminé n'augmente pas de façon importante dans la fraction aminée libre de l'Algue, par rapport à celle d'un témoin placé dans de l'eau de mer pure. L'ornithine et la citrulline de même, ne s'accumulent pratiquement pas (+ 1,5 et + 15,3 µM respectivement).

Par contre, si la Céramiale se trouve dans un milieu qui contient de l'ornithine, les teneurs de cet acide aminé et de la citrulline s'élèvent beaucoup au sein de la fraction azotée soluble (+ 19,7 et 53,7 µM respectivement). Mais la quantité d'arginine ne s'accroît pas.

Dans l'un et l'autre cas, les sommes globales des acides aminés libres augmentent par rapport à celle du témoin. L'acide glutamique, l'alanine et, à un moindre degré, l'acide aspartique et la proline, sont après la citrulline, les composés responsables de ces augmentations.

Les variations observées dans les concentrations des acides aminés libres, quand *Polysiphonia lanosa* est placée dans une eau de mer enrichie en arginine, sont peu accusées. Elles se situent, pour la somme des acides aminés libres comme pour la citrulline et la proline, dans la limite des erreurs d'expérience. Mais pour l'arginine, l'ornithine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'alanine, elles sont nettement supérieures à cette limite. Dans l'essai réalisé avec l'ornithine, les modifications constatées sont toutes importantes et significatives, sauf pour la proline.

Conclusions : *Polysiphonia lanosa* semble donc pourvoir absorber l'ornithine et l'arginine à partir de l'eau de mer et les intégrer dans son métabolisme. Les valeurs des concentrations de l'arginine restent toujours peu élevées dans la fraction aminée libre de l'Algue, alors que celles de l'ornithine augmentent sensiblement, lorsque le milieu extérieur contient respectivement l'un ou l'autre de ces acides aminés. Ces faits peuvent traduire des vitesses de pénétrations différentes pour ces deux composés, ou bien leur utilisation plus ou moins rapide dans le métabolisme de la plante.

Les concentrations d'autres acides aminés libres sont également affectées au cours de ces absorptions d'ornithine ou d'arginine, celles de l'alanine, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de la proline notamment. Ces variations mettent en évidence d'autres modifications qui se produisent dans la fraction aminée soluble, et qui sont probablement liées aux acides aminés fournis à l'Algue.

En présence d'ornithine, c'est la citrulline qui accuse les variations de concentrations les plus importantes. Il semble donc qu'il existe un lien direct entre ces deux acides aminés. Par contre, les résultats de ces expériences n'in-

diquent pas clairement les relations qu'il peut y avoir entre eux et l'arginine. Pour préciser ces premières données et obtenir des renseignements complémentaires, une absorption d'ornithine marquée au ^{14}C a été entreprise.

B. - ABSORPTION D'ORNITHINE RADIOACTIVE

L'ornithine radioactive utilisée était de la D-L-ornithine, 5-^{14} C monochlorhydrate, d'activité spécifique égale à 8,3 mCi par mM, fournie par le C.E.A.

1. - Protocole expérimental

Les Algues, préparées comme pour l'expérience précédente, sont placées dans 100 ml d'eau de mer stérile contenue dans des erlenmeyers stérilisés. On laisse une nuit au repos. On ajoute 500 µM d'ornithine (5 µM par ml) puis, après agitation, la quantité (0,5 ml) d'ornithine marquée nécessaire pour fournir au milieu une dose de radioactivité égale à 50 µCi (0,5 µCi par ml). On agite, on laisse cinq heures à l'obscurité puis deux heures à la lumière du jour.

On élimine le milieu. On rince les Algues avec de l'eau de mer stérile (3 fois 100 ml) puis avec de l'eau déminéralisée (3 fois 100 ml). 2 ml de la dernière fraction de rinçage sont évaporés dans une coupelle. A ce moment, leur radioactivité, mesurée au compteur GEIGER-MULLER, est nulle.

Les Algues sont fixées par ébullition dans l'éthanol à 95° pendant quinze minutes. Elles sont alors broyées dans un mortier en présence de l'alcool de fixation, qui est recueilli après décantation. Les Algues sont encore malaxées soigneusement pendant quelques minutes dans chacun des liquides d'extraction suivants : éthanol à 50° (2 fois) et eau bidistillée (2 fois).

Les extraits réunis (200 ml environ) sont centrifugés et évaporés. Le résidu d'évaporation est repris par de l'eau distillée et fixé sur une colonne de résine DOWEX 50 (100-200 mesh), forme H^+. Après rinçage de la colonne, les acides aminés sont élués par une solution d'ammoniaque 2N (150 ml). L'éluat est évaporé et le résidu repris dans le minimum d'eau bidistillée.

TABLEAU XX

Radioactivité de quelques acides aminés libres
de Polysiphonia lanosa
après absorption d'ornithine 5-^{14} *C*

Acides aminés	c/mn
Ornithine	334
Citrulline	160
Arginine	38
Proline	156
Acide glutamique	31
Alanine	+
Acide aspartique	+
Composé inconnu	+++

Valeurs obtenues pour un chromatogramme, bruit de fond déduit
+ = très faible activité
+++ = activité relativement importante, décelée sur l'autoradiogramme

Cette solution est chromatographiée (papier WHATMANN n° 1 ; solvants : butanol-acide acétique-eau, 40 : 10 : 50 et phénol-eau, 80 : 20). Certains chromatogrammes sont appliqués contre des films radiographiques KODIREX, pour obtenir des autoradiogrammes. Les taches des acides aminés intéressants pour cette étude sont localisés dans la lumière ultraviolette, sur d'autres chromatogrammes. Des surcharges d'ornithine et d'arginine sont nécessaires pour repérer ces acides aminés, présents en très faibles concentrations dans les extraits. Les plages des chromatogrammes correspondant aux composés à étudier sont découpées et placées, après fragmentation, dans des fioles de comptage contenant un liquide scintillant, dont la composition est la suivante : 0,5 g de p-phénylène-2,2' -bis (méthyl-4-phényl-5-oxazole) et 5 g de diphényl-2,5-oxazole, en solution dans un litre de toluène.

Les mesures de la radioactivité se font au compteur à scintillation liquide NUCLEAR-CHICAGO, immédiatement après la chromatographie.

2. - Résultats et commentaires

Les plus fortes activités se rapportent à l'ornithine, puis à la citrulline et à la proline, dont les valeurs sont très voisines. Celles que présentent l'arginine et l'acide glutamique sont nettement plus faibles. Une très légère radioactivité a également été décelée pour l'acide aspartique et l'alanine (Tableau XX).

Ultérieurement, l'examen des autoradiogrammes a permis de reconnaître les taches correspondant à l'ornithine, la citrulline, la proline et à un autre composé inconnu, dont le taux de radioactivité, en se basant sur l'intensité des taches de l'autoradiogramme, paraît équivalente à celles de la citrulline ou de la proline. La localisation de ce dernier composé sur le chromatogramme correspond soit à l'emplacement de l'acide gamma-amino-butyrique, soit à celui de la méthéonine et de la valine, non séparées par ce système de solvants. L'identification de cette substance reste à préciser.

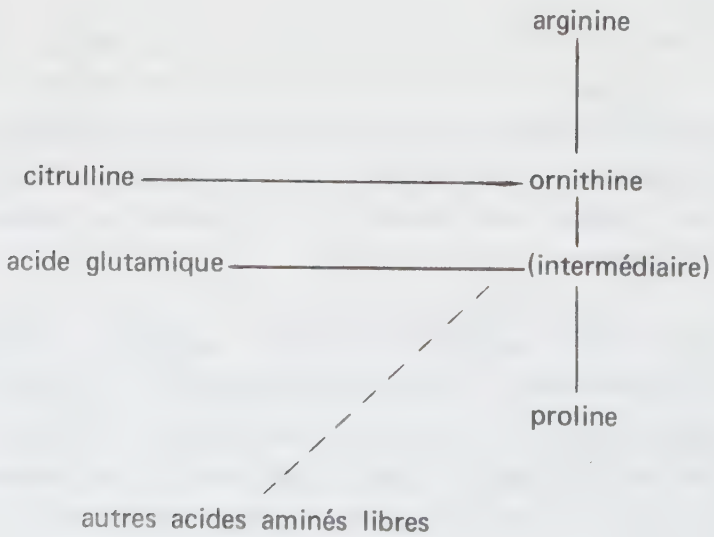
Les résultats de cette absorption d'ornithine radioactive confirment donc ceux qui ont été obtenus dans l'expérience précédente. Ils montrent que la molécule de cet acide aminé peut être absorbée par l'Algue, puisqu'on la retrouve dans sa fraction aminée libre. De plus, cette molécule est métabolisée par *Polysiphonia lanosa,* dans le cadre de conversions entre la citrulline, l'argi-

nine, l'acide glutamique, la proline et le composé inconnu. Un lien métabolique unit donc ces six composés. Les chiffres plus faibles obtenus pour l'arginine et l'acide glutamique peuvent indiquer que ces deux acides aminés ont un turn-over élevé, qu'ils ne sont que des termes de passage, ou bien que les voies d'utilisation de l'ornithine les concerne à un degré moindre. Il faut toutefois signaler que leurs concentrations dans les extraits, par rapport à celles de la citrulline et de la proline, sont faibles, surtout celle de l'arginine.

Les activités voisines de la citrulline et de la proline peuvent indiquer, comme chez d'autres végétaux, l'existence de deux voies métaboliques qui relient l'ornithine à la citrulline d'une part, et l'ornithine à la proline d'autre part.

D'autres acides aminés à chaîne carbonée plus courte que celle de l'ornithine apparaissent également radioactifs, l'acide aspartique et l'alanine notamment. Cela indique que la molécule d'ornithine est dégradée par *Polysiphonia lanosa.* La durée de l'expérience ayant été assez longue, ces remaniements ne sont pas surprenants.

Au terme de cette expérience d'absorption d'ornithine radioactive il est possible d'ébaucher un schéma rendant compte de certaines relations qui peuvent exister entre la citrulline et d'autres acides aminés libres chez *Polysiphonia lanosa.*



Toutefois, s'il est évident que ces différents composés sont réunis entre eux, le sens du passage de l'un à l'autre n'est pas établi, celui-ci pouvant emprunter des chemins différents. Pour connaître les voies suivies, il est indispensable de rechercher la présence des enzymes impliquées dans chacune d'elles.

C. - ETUDE ENZYMATIQUE

1. - Les difficultés de l'étude enzymatique

JACOBI (1962) a récemment souligné les difficultés que présente l'étude des systèmes enzymatiques des Algues marines. L'emploi des méthodes dites "classiques", qui utilisent comme source d'enzyme une poudre sèche du végétal étudié, ou un extrait de la plante fraîche, m'a permis de constater que la mise en évidence des activités enzymatiques par de telles méthodes était pratiquement impossible pour *Polysiphonia lanosa.*

Les premiers essais ont abouti à des résultats essentiellement négatifs. Ils ont montré la nécessité d'avoir recours à des techniques différentes, basées sur l'extraction, la purification et le fractionnement des protéines de l'Algue, afin d'éliminer les substances inhibitrices.

a. - Mise en évidence d'une action inhibitrice

L'absence d'activité enzymatique dans les poudres sèches et dans les extraits de thalles frais de *Polysiphonia lanosa* était surprenante. Afin de vérifier si ce végétal ne possédait réellement aucune potentialité enzymatique ou si ce matériel contenait des inhibiteurs, j'ai réalisé les expériences suivantes, avec des préparations enzymatiques de référence :

- uréase purifiée (BIOLYON) en présence de poudres de l'Algue,
- ornithine transcarbamylase de germinations de Blé en présence d'extraits frais de *Polysiphonia lanosa.*

- **L'uréase**

On réalise une suspension d'uréase BIOLYON, contenant 2 mg de poudre enzymatique par millilitre de solution.

Le milieu d'incubation contient 5 ml d'une solution d'urée 0,04 M dans le tampon phosphate de pH 7,0 (CLARK et LUBS), 1 ml de la suspension d'uréase BIOLYON et deux gouttes de toluène.

Parallèlement, un essai est effectué dans les mêmes conditions, mais en présence de 50 mg de poudre sèche de *Polysiphonia lanosa.*

On réalise deux témoins : l'un ne contient que la poudre végétale, l'autre que l'urée.

TABLEAU XXI

Mise en évidence de l'action inhibitrice de la poudre sèche de Polysiphonia lanosa *sur l'activité de l'uréase BIOLYON*

	urée dégradée	Pourcentage d'inhibition
uréase seule	11,9 mg	
uréase + poudre de *Polysiphonia*	4,2 mg	64,2
poudre de *Polysiphonia* seule	0	

Après deux heures au bain-marie à 38°C, les fioles sont placées dans de la glace fondante et la réaction est stoppée par addition de 1 ml de HCl N. Le dosage de l'ammoniaque engendrée est réalisé suivant la technique de Yovanovitch. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau XXI.

Donc, dans ces conditions expérimentales, l'activité de l'uréase BIOLYON est réduite de 64,2 % en présence d'une poudre sèche de *Polysiphonia lanosa.* Le matériel végétal contient des composés qui inhibent très fortement l'action de cette enzyme.

- **L'ornithine transcarbamylase**

Les jeunes germinations de Blé présentent une activité ornithine-transcarbamylasique importante (REIFER et coll., 1963). J'ai réalisé des extraits enzymatiques à partir de germinations de dix jours, dans les conditions décrites par ces auteurs : 3 g de germinations congelées (- 18°C) sont broyées dans un mortier, préalablement refroidi à -18°C, et placé dans un mélange de glace fondante et de sel. On ajoute 15 ml de tampon phosphate de pH 7,2 (CLARK et LUBS). Après quinze minutes d'incubation à la température du laboratoire, en agitant souvent, on centrifuge à la centrifugeuse refroidie (à 0°C environ), pendant 30 minutes à 4 000 t/mn.

Un second extrait est obtenu exactement dans les mêmes conditions à partir de thalles frais de *Polysiphonia lanosa.*

Le milieu d'incubation, tamponné à pH 7,2 (CLARK et LUBS), contient 20 µM d'ornithine, 20 µM de carbamylphosphate, 0,5 ml d'extrait enzymatique. Les tubes sont placés 30 mn au bain-marie à 30°C. Les témoins sont réalisés dans les mêmes conditions (REIFER et coll., 1963).

Pour arrêter la réaction, on place les tubes d'expérience dans la glace fondante et on ajoute 2 ml d'acide trichloracétique à 10 % . Le contenu des tubes est transvasé quantitativement dans des fioles jaugées de 25 ml et on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée. La citrulline est alors dosée sur une fraction aliquote de cette solution filtrée, suivant la méthode d'ARCHIBALD (1944) modifiée par ELODI (1954).

TABLEAU XXII

Mise en évidence de l'action inhibitrice d'extraits de thalles frais de Polysiphonia lanosa *sur l'activité de l'ornithine transcarbamylase des germinations de blé*

	Citrulline apparue pour 0,5 ml d'extrait	Pourcentage d'inhibition
Extrait de Blé	0,36 µM	
Extrait de Blé + extrait de *Polysiphonia*	0,10 µM	72,2
Extrait de *Polysiphonia*	0	

Les résultats de cette étude (Tableau XXII) menée avec des sources enzymatiques connues montrent qu'il existe dans les extraits de thalles frais de *Polysiphonia lanosa,* comme dans la poudre sèche de cette Algue, une (ou des) substance inhibitrice qui intervient sur les activités ornithine transcarbamylasique et uréasique. Dans mes conditions expérimentales, cette inhibition est de l'ordre de 72 % pour l'ornithine transcarbamylase.

b. - Essais pratiqués pour lever l'inhibition

Les composés qui peuvent gêner l'action des enzymes sont nombreux. L'action inhibitrice de certains ions métalliques, des polyphénols, par exemple, est bien connue. Les conditions d'action des enzymes sont également très strictes, et pour obtenir l'activité maximale il est nécessaire de déterminer la température,

le pH, la nature du tampon, la concentration en substrat, ... pour chaque espèce étudiée, ces conditions pouvant varier de l'une à l'autre.

Dans cette étude, j'ai envisagé successivement l'action

- des ions métalliques,
- des tampons,
- des grosses molécules : polyphénols,
  polysaccharides sulfatés.

- **Elimination des ions métalliques**

Les Algues marines vivent dans un milieu particulièrement riche en ions minéraux variés. Il est possible que, lors de la préparation du matériel, l'eau de mer qui imprègne leur thalle ne soit pas complètement éliminée par les rinçages successifs à l'eau déminéralisée. Les poudres peuvent ainsi contenir des ions étrangers en quantités plus ou moins importantes.

L'addition de complexon III (EDTA) M/1000 dans les essais pratiqués pour mettre en évidence les activités arginasique, ornithine transcarbamylasique et uréasique n'a apporté aucune amélioration des résultats.

La dialyse d'extraits de poudres sèches et de matériel frais a alors été tentée. Les essais étaient réalisés à $4^{o}C$, pendant des temps allant de 10 à 48 heures, contre de l'eau distillée ou des tampons variés (phosphates, éthanolamine, tris-HCl). Mais les expériences entreprises avec ces extraits dialysés n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats, bien que les métaux pouvant être nécessaires à l'activité de certaines enzymes, éliminés au cours de la dialyse, aient été rajoutés dans le milieu réactionnel (Mn pour l'arginase, Mg pour l'arginine synthétase et la citrullinase).

L'emploi de composés protecteurs des groupements -SH (cystéine, mercaptoéthanol), n'a pas davantage permis d'améliorer les résultats.

- **Essais de tampons variés**

Il est reconnu que la nature du tampon peut influer sur certaines réactions enzymatiques. Dans le cas des Algues marines, JACOBI (1962) a pu

montrer qu'elle intervenait également sur l'efficacité de l'extraction des protéines enzymatiques.

J'ai testé en particulier les tampons phosphates (CLARK et LUBS), tris-HCl, éthanolamine, sans obtenir de différences significatives.

- **Elimination des polyphénols**

Les polyphénols ont une action inhibitrice sur certaines enzymes (LOOMIS et BATTAILE, 1966 ; BADRAN et JONES, 1965) et en particulier sur l'arginase (LARHER, 1968). Un phénol bromé ayant été extrait de *Polysiphonia lanosa*, (AUGIER, 1953), il importait de savoir si ce composé ou d'autres de même nature, n'était pas à l'origine de l'inhibition constatée. J'ai utilisé du polyéthylène glycol 6000 (à 1 %) et de la polyvinylpyrrolidone (à 1 %) afin de précipiter les composés phénoliques lors de l'extraction. Mais il n'en est pas résulté de précipitation appréciable, et l'action enzymatique n'a pas été stimulée.

- **Elimination des polysaccharides**

Les Algues marines, et les Rhodophycées en particulier, contiennent de fortes concentrations de polygalactanes sulfatés du type gélose et carrageenine qui peuvent se combiner avec des protéines pour former des complexes très difficiles à dissocier. L'action enzymatique des protéines qui entrent dans ces complexes est ainsi bloquée (BERNFELD et coll., 1965). Ces liaisons se constituent surtout lors de la désintégration du matériel végétal et de son extraction (SMITH et YOUNG, 1953).

J'ai d'abord étudié l'activité de l'ornithine transcarbamylase des germinations de Blé en présence de solutions à 0,5 % de carrageenates de sodium et de calcium, et d'alginate de sodium. Au contact de ces produits, aucune diminution de l'activité de cette enzyme n'a été observée. Mais il est possible que la structure de ces polysaccharides ait été modifiée au cours de leur isolement et de leur purification, ou que leurs groupements actifs aient été neutralisés.

Certains composés précipitent ces polygalactanes, le chlorure de cétylpyridinium en particulier (TURVEY, 1961). Une solution à 0,5 ou à 1 % de ce composé ne provoque qu'une très légère diminution de l'activité ornithine transcarbamylasique des germinations de Blé. Ajouté au milieu d'expérience contenant, comme source enzymatique, de la poudre sèche ou un extrait de matériel frais de *Polysiphonia lanosa,* avant ou après l'extraction, il provoque une abondante précipitation. Mais l'activité des enzymes n'est pas révélée après cette action.

Les essais consécutifs pour tenter de mettre en évidence une activité enzymatique mesurable à partir de poudres sèches ou d'extraits de thalles frais de *Polysiphonia lanosa* aboutissant toujours à des résultats négatifs, il restait à tenter l'isolement des fractions protéiques de l'Algue.

2. - Essai d'isolement des protéines enzymatiques

Plusieurs méthodes ont été employées pour extraire les protéines : à partir de poudres séchées sur chlorure de calcium, d'Algues fraîches avant ou après congélation, de poudres acétoniques. Différents tampons, contenant des composés susceptibles de protéger les protéines ou d'éliminer les substances gênantes (mercaptoéthanol, cystéine, E.D.T.A., polyéthylène-glycol, polyvinylpyrrolidone, ...) ont été essayés.

Ce travail a abouti à la mise au point d'un protocole expérimental dérivé de ceux de LEVENBERG (1962), DAVIS (1965), KASHIWABARA et coll. (1965), SORU (1965) et TOCHER et MEUSE (1966) principalement. Ces auteurs extraient les protéines enzymatiques dans une solution tampon (phosphate ou Tris), à basse température, purifient et fractionnent les préparations par précipitation au sulfate d'ammonium et filtration sur colonne de Sephadex ou séparation sur D.E.A.E. cellulose.

LEVENBERG (1962), dans un travail sur la synthèse enzymatique de la citrulline chez *Agaricus bisporus,* extrait les protéines dans une solution tampon (phosphate de potassium 0,05 M, pH 7,5) contenant du mercaptoéthanol (0,04 M) et de l'EDTA (0,004 M). L'extrait est dialysé contre un tampon de même pH (phosphate de potassium 0,02 M), contenant du mercaptoéthanol (0,005 M) et de l'EDTA (0,0005 M). La solution est centrifugée et les protéines précipitées par le sulfate d'ammonium (73 g pour 252 ml). Après centrifugation (25 000 g, 15 mn), les protéines précipitées sont lavées par du sulfate d'ammonium à 31 %, puis centrifugées à nouveau. Les protéines sont remises en solution dans le mercap-

toéthanol (0,003 M). Après centrifugation, la solution est passée sur une colonne de Sephadex G 25 et les protéines sont éluées par de l'eau. Du tampon phosphate (M) pH 7,5 et du mercaptoéthanol (M) sont ajoutés à l'éluat. Puis la solution est traitée successivement par du sulfate de protamine (à 2,7 °/o), du charbon NUCHAR C.190.N, et du gel d'hydroxylapatite. La solution est alors passée sur une colonne de DEAE-cellulose (2,4 x 8 cm) équilibrée avec un tampon phosphate, successivement 0,005 M, 0,06 M et 0,18 M. Du mercaptoéthanol est ajouté à la solution (0,005 M), et les protéines sont à nouveau précipitées par du sulfate d'ammonium à 50 °/o (en poids). Elles sont ensuite redissoutes dans le tampon phosphate de potassium (0,03 M), pH 7,5, contenant du mercaptoéthanol (0,005 M) et de l'EDTA (0,0003 M). Après dialyse (5 heures) contre 200 volumes de la même solution, l'extrait enzymatique est utilisé pour les différentes réactions.

DAVIS (1965), pour la purification de la carbamylphosphokinase de *Neurospora*, utilise la technique d'extraction résumée ci-après. La poudre acétonique du Champignon est extraite par un tampon phosphate de potassium (0,05 M) de pH 7,0. Les protéines sont fractionnées par précipitations successives au sulfate d'ammonium, à différentes concentrations, puis par passage sur une colonne de DEAE-cellulose, équilibrée avec un tampon phosphate de potassium (0,02 M) de pH 7,0, contenant du chlorure de magnésium (0,05 M) et du mercaptoéthanol (0,02 °/o). L'élution est réalisée par le tampon précédent (0,05 M, pH 7,0) contenant du chlorure d'ammonium 0,075 M. Les protéines sont à nouveau précipitées par le sulfate d'ammonium (28 g pour 70 ml). Le précipité est dissous dans le tampon phosphate de potassium (0,02 M) de pH 7,0 et la solution est passée sur une colonne de Sephadex G 25 pour éliminer le sulfate d'ammonium.

KASHIWABARA (1965), dans une étude du métabolisme de l'amidon chez *Ulva lactuca*, homogénéise les Algues, préalablement congelées puis ramenées à la température ordinaire, dans un tampon Tris 0,05 M, de pH 8,0, contenant de la cystéine 0,001 M et de l'EDTA 0,001 M. L'extrait est fractionné par le sulfate d'ammonium (0,3 à 0,8 de saturation). Le précipité est dissous dans le tampon précédent et dialysé contre ce même tampon dilué (0,001 M), contenant de la cystéine 0,001 M et de l'EDTA 0,001 M. Les protéines sont ensuite lyophylisées.

SORU (1965), pour purifier l'arginase de *Staphyl-ococcus aureus* et *Bacillus anthracis*, utilise des poudres acétoniques, et les extrait par une solution aqueuse de chlorure de manganèse (0,001 M). Puis, il précipite les protéines par l'acétone (1 : 4, vol/vol). Le précipité, séché sous vide, dissous dans une solution de chlorure de manganèse et chlorure de sodium (0,005 M - 0,153 M), est passé sur une colonne de Sephadex G 25 (2 x 25 cm) équilibrée avec la solution précédente. Après élution des protéines par cette même solution, l'activité arginasique est déterminée dans les différentes fractions de l'éluat. L'arginase est ensuite purifiée par précipitation à l'acétone, puis électrophorèse sur Sephadex G 200 (tampon véronal-acétate, pH 8,6).

TOCHER et MEUSE (1966), utilisent une méthode plus simple pour extraire la phénolase de *Monotroma fuscum*. Les Algues fraîches sont homogénéisées dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, de pH 7,0. Les protéines sont précipitées par le sulfate d'ammonium (0,3 à 0,8 de saturation), puis lyophylisées.

En suivant ces méthodes plus ou moins modifiées, des résultats positifs ont pu être acquis pour l'uréase, l'arginase et l'ornithine transcarbamylase. Mais les activité demeuraient très faibles. La principale difficulté résidait dans la mauvaise séparation obtenue avec la colonne de Sephadex G 25, la phycoérythrine, très abondante, masquant et diluant toutes les autres fractions protéiques.

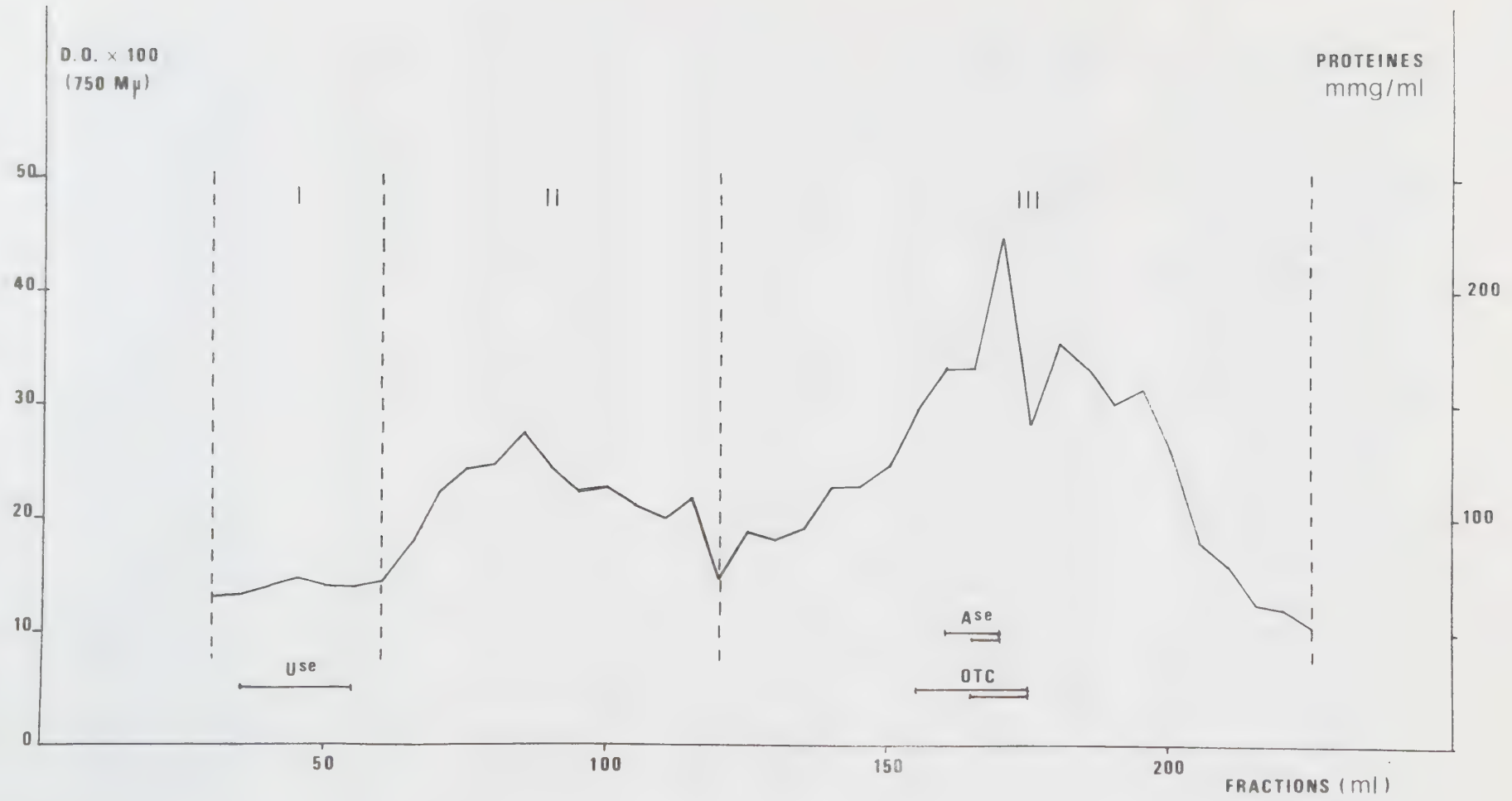


Fig. 26 - Exemple de fractionnement des protéines totales de *Polysiphonia lanosa*, obtenu par filtration sur la colonne de Sephadex G 75 (voir le texte p. 121).

Les expériences ont alors été reprises en utilisant de la Sephadex G 75, et en appliquant directement l'extrait brut, obtenu à partir d'Algues fraîches congelées, sur la colonne (BRUNEL, communication personnelle).

Protocole expérimental : 2 à 3 g de *Polysiphonia lanosa* frais sont congelés puis broyés dans un mortier préalablement refroidi à -18°C et placé dans un mélange de glace fondante et de sel marin. Les Algues sont alors extraites par 15 à 20 ml de tampon phosphate (CLARK et LUBS) de pH 7,0. Cette solution tampon contient de la cystéine M/1000 et de l'EDTA M/1000, et est maintenue à une température inférieure à 4°C.

Après 30 mn au réfrigérateur, le broyat est centrifugé à la centrifugeuse refroidie (0°C), à 4000 t/mn, pendant 30 mn.

Le surnageant est placé sur une colonne de Sephadex G 75 (3 x 32 cm), équilibrée avec le tampon précédent. La colonne est maintenue dans une enceinte à 4°C pendant la durée de l'élution.

Les protéines sont éluées de la colonne par le même tampon phosphate, et on recueille des fractions de 5 ou 10 ml (60 ou 30 fractions). Une première analyse qualitative permet de localiser celles qui présentent une action enzymatique qui est alors déterminée sur ces fractions. Les protéines sont dosées suivant la méthode de LOWRY (1951) sur 0,1 ml de solution. Une solution de protéines de Boeuf (N.B.C.) a servi pour établir la courbe d'étalonnage de référence.

La figure 26 donne un exemple de fractionnement des protéines totales de *Polysiphonia lanosa,* obtenu par filtration sur une colonne de Sephadex G 75, dans les conditions qui viennent d'être précisées. Trois fractions protéiques principales ont été obtenues. La première (I) est pratiquement incolore et présente une faible concentration en protéines (environ 70 µg de protéines par ml). C'est dans cette partie de la courbe que l'activité uréasique a pu être localisée.

La deuxième fraction (II), fortement colorée en rose-violet, correspondait essentiellement à la phycoérythrine. La troisième (III) présentait une coloration brun-jaune dans sa première partie, puis jaune de plus en plus pâle dans la seconde. Les activités arginasique et ornithine transcarbamylasique ont été obtenues dans cette fraction III, dans les tubes qui contenaient les plus fortes concentrations de protéines (150 à 225 µg par ml) et qui présentaient encore une coloration jaune bien marquée.

Pour les essais de mise en évidence de la citrullinase (emploi de l'appareil de WARBURG), le fractionnement de l'éluat a été moins important (2 à 6 fractions).

Les essais pratiqués pour tenter de mettre en évidence les activités enzymatiques ont été réalisés à l'aide d'extraits qui contenaient environ 70 µg de protéines par millilitre pour l'uréase, 100 à 150 µg pour l'arginase, l'ornithine transcarbamylase, l'arginine désimidase, l'arginine synthétase, les transaminases, et 400 µg pour la citrullinase.

3. - Etude des enzymes

a. - L'arginase

Cette enzyme provoque la dégradation de l'arginine en ornithine et urée. Sa présence est bien établie chez les végétaux pour lesquels ces conditions optimales d'action ont été largement étudiées (GUITTON, 1964).

TABLEAU XXIII

Protocole expérimental pour la mise en évidence de l'arginase (D'après GREENBERG, 1955)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate, pH 9,5	0 ml	0,5 ml
Arginine 0,85 M, dans le tampon pH 9,5	0,5 ml	-
Extrait enzymatique (100 µg de protéines) dans le tampon, pH 9,5	1,0 ml	1,0 ml
Mn^{++} (Cl_2Mn M/1000 dans le tampon)	0,1 ml	0,1 ml

Après deux heures au bain-marie, à la température de 43°C, la réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans la glace fondante et en ajoutant immédiatement 1 ml d'acide acétique à 87 °/₀ .

Les acides aminés et autres substances qui peuvent interférer dans le dosage de l'urée sont éliminés sous forme de sels de baryum, en ajoutant 1,5 ml de $Ba(OH)_2$, 0,073 M ; les ions Ba en excès sont précipités par addition de 0,4 ml de $ZnSO_4$, 0,0375 M. On centrifuge pendant 10 mn à 3000 t/mn (SATOH et ITO, 1968). L'urée est alors dosée sur une fraction aliquote du surnageant, par la méthode d'ELODI (1954).

Pour comparaison, dans d'autres essais, la réaction a été arrêtée en ajoutant 2 ml d'acide trichloracétique dans chaque tube, ceux-ci étant placés dans de la glace fondante. La solution est transvasée quantitativement dans des fioles jaugées ; après équilibration des fioles, homogénéisation et filtration, l'arginine résiduelle est dosée sur une fraction aliquote du filtrat, par la méthode de SATAKE et LUCK (1958).

b. - L'uréase

L'urée libérée lors de l'action de l'arginase sur l'arginine est hydrolysée par l'uréase, qui la scinde en CO_2 et NH_3. Cette enzyme est extrêmement sensible aux conditions de température, de pH, de concentration en substrat,...

TABLEAU XXIV

Protocole expérimental pour la mise en évidence de l'uréase (D'après SEHGAL et NAYLOR, 1966)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate (CLARK et LUBS), pH 7,0	0,5 ml	1,0 ml
Urée, 10 µM, dans le tampon, pH 7,0	0,5 ml	0 ml
Extrait enzymatique (70 µg de protéines) dans le tampon, pH 7,0	1,0 ml	1,0 ml

Les tubes sont placées deux heures au bain-marie à la température de 38°C. Pour arrêter la réaction, ces tubes sont plongés dans la glace fondante et on ajoute immédiatement 1 ml d'acide acétique à 87 °/₀ .

L'urée résiduelle est alors dosée par la méthode d'ELODI (1954), sur une fraction aliquote du milieu réactionnel, après traitement par la baryte dans les conditions qui viennent d'être précisées pour l'arginase.

c. - L'ornithine transcarbamylase

La synthèse de la citrulline peut se faire à partir de l'ornithine et du carbamylphosphate, lorsque l'ornithine transcarbamylase est présente. C'est la voie qui a été le plus souvent démontrée dans l'élaboration de la molécule de l'aminoacide.

L'activité de l'enzyme est maximale à pH 7,4, pour des concentrations en ornithine de 0,2 M et en carbamylphosphate de 0,4 M (REIFER et KLECZKOWSKI, 1960-1961). Le carbamylphosphate est un produit très instable en solution et son hydrolyse augmente rapidement avec la température (environ deux heures de stabilité à 30°C). Il importe donc de réduire le temps de réaction et de travailler à une température ne dépassant pas 30°C, une synthèse chimique de la citrulline pouvant intervenir à des températures supérieures.

TABLEAU XXV

Protocole expérimental pour la mise en évidence de l'ornithine transcarbamylase (REIFER et coll., 1963)

	Essai	Témoin I	Témoin II
Tampon phosphate (CLARK et LUBS), pH 7,2	1,3 ml	1,8 ml	1,5 ml
Ornithine, 20 µM, dans le tampon, pH 7,2	0,1 ml	0,1 ml	0 ml
Extrait enzymatique (150 µg), dans le tampon, pH 7,2	0,5 ml	0 ml	0,5 ml

La durée de l'expérience est de 30 mn ou 1 heure, à une température de 30°C. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 10 °/₀ , les tubes étant placés dans la glace fondante.

Les solutions sont transvasées quantitativement dans des fioles jaugées et la citrulline apparue est dosée suivant la technique d'ARCHIBALD (1944), modifiée par ELODI (1954), sur une fraction aliquote, après filtration.

d. - L'arginine désimidase

Cette enzyme provoque la dégradation de l'arginine en citrulline et ammoniac. Elle a une activité maximum pour des pH situés entre 5,8 et 7,0 (OGINSKY, 1955). Elle est présente chez *Chlorella pyrenoidosa* (WALKER et MYERS, 1953). Pour la mettre en évidence, les essais suivants sont réalisés.

TABLEAU XXVI

Protocole expérimental pour la mise en évidence de l'arginine désimidase (OGINSKY, 1955)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate (CLARK et LUBS), pH 6,5	0 ml	1,0 ml
Arginine 0,1 M dans le tampon, pH 6,5	1,0 ml	0
Extrait enzymatique (150 µg de protéines) dans le tampon, pH 6,5	1,0 ml	1,0 ml

Après deux heures à 38°C, l'arrêt de la réaction, les dilutions et le dosage de la citrulline apparue, sont réalisés comme pour l'étude de l'ornithine

transcarbamylase. Pour contrôle, on pratique également le dosage de l'arginine résiduelle, par la méthode de SATAKE et LUCK (1958).

4. - Résultats et commentaires

Des activités positives ont pu être mises en évidence pour l'ornithine transcarbamylase, l'uréase et l'arginase. Pour l'uréase, cette activité était toujours très faible, et, pour l'arginine désimidase, elle s'est constamment révélée nulle.

Mais les résultats étaient très inconstants d'une préparation enzymatique à l'autre. Il n'était pas possible, dans ces conditions, d'en fournir une évaluation quantitative. A titre indicatif toutefois, et pour discussion, les chiffres suivants peuvent être retenus. Ils correspondent à une moyenne pour l'ornithine transcarbamylase et aux plus fortes valeurs pour l'uréase et l'arginase.

Activités déterminées pour :

- L'ornithine transcarbamylase : 0,2 µM de citrulline synthétisée par mg de protéine et par heure.
- L'uréase : 15 µM d'urée dégradée par mg de protéine et par heure.
- L'arginase : 30 µM d'arginine dégradée par mg de protéine et par heure.

Les activités obtenues pour l'ornithine transcarbamylase sont sensiblement du même ordre de grandeur que celles publiées par REIFER et coll. (1963) pour 46 espèces de plantes supérieures (0,12 à 0,86 µM de citrulline synthétisée par mg de protéine et par heure pour les graines, et 0,2 à 2,88 µM pour les germinations). Mais, pour l'uréase et pour l'arginase, les activités sont très faibles comparées à celles qui ont pu être obtenues pour d'autres végétaux. Ainsi, par exemple, l'unité uréasique définie par SEHGAL et NAYLOR (1966) pour *Canavalia ensiformis*, est la quantité d'enzyme qui, en une minute et à $23^{o}C \pm 1$, hydrolyse une micromole d'urée. L'activité déterminée par ces auteurs pour un extrait aqueux d'une poudre sèche de la plante est de 504 µM d'urée hydrolysée par mg de protéine et par heure.

Conclusion : Malgré les difficultés rencontrées, cette recherche des enzymes qui peuvent intervenir dans la synthèse de la citrulline a permis de confirmer et de préciser les résultats qui ont été obtenus lors de l'absorption d'ornithine et d'arginine, puis d'ornithine radioactive. Chez *Polysiphonia lanosa* comme chez d'autres végétaux, la citrulline peut être synthétisée à partir de l'ornithine, par l'intermédiaire de l'ornithine transcarbamylase. En outre, le lien étant établi entre l'arginine et l'ornithine, grâce à l'arginase, l'arginine peut donc se trouver aussi sur le chemin de la synthèse de la citrulline chez cette Algue.

DEUXIEME CHAPITRE

DEGRADATION DE LA CITRULLINE

La citrulline, par ses groupements aminés, et en raison de sa forte concentration dans la fraction azotée soluble de *Polysiphonia lanosa*, peut constituer pour la plante une réserve relativement importante d'azote. Une absorption de cet acide aminé, marqué au ^{14}C, a donc été tentée, pour savoir si l'Algue pouvait réutiliser ce composé, et pour suivre les voies de son utilisation métabolique. Cette expérience a été complétée par une étude des enzymes reconnues responsables, chez d'autres organismes vivants, de la transformation de la citrulline.

A. - ABSORPTION DE CITRULLINE MARQUEE

La citrulline utilisée pour cette expérience, fournie par le C.E.A., était de la D-L-citrulline 5-^{14}C, dont l'activité spécifique était de 13,5 mCi/mM.

1. - Protocole expérimental

LINSKENS (1963), pour évaluer l'absorption et le transport de phosphore radioactif d'Algues marines "supports" aux épiphytes, et inversement, a utilisé un dispositif expérimental dans lequel l'un des deux végétaux étudiés simultanément (le "support" ou l'épiphyte suivant le cas) est placé hors de l'eau de mer, dans une enceinte saturée d'humidité. L'autre plante plonge seule dans la solution qui contient le composé à absorber. Dans ces conditions, le phosphore marqué, par l'intermédiaire de l'Algue immergée, est absorbé activement dans tout le thalle de l'espèce émergée.

Ce dispositif expérimental possède plusieurs avantages par rapport à celui qui consiste à plonger entièrement le thalle dans l'eau de mer :

- Il permet de limiter de façon importante le volume de la solution radioactive. On peut ainsi obtenir une solution plus concentrée, et utiliser moins

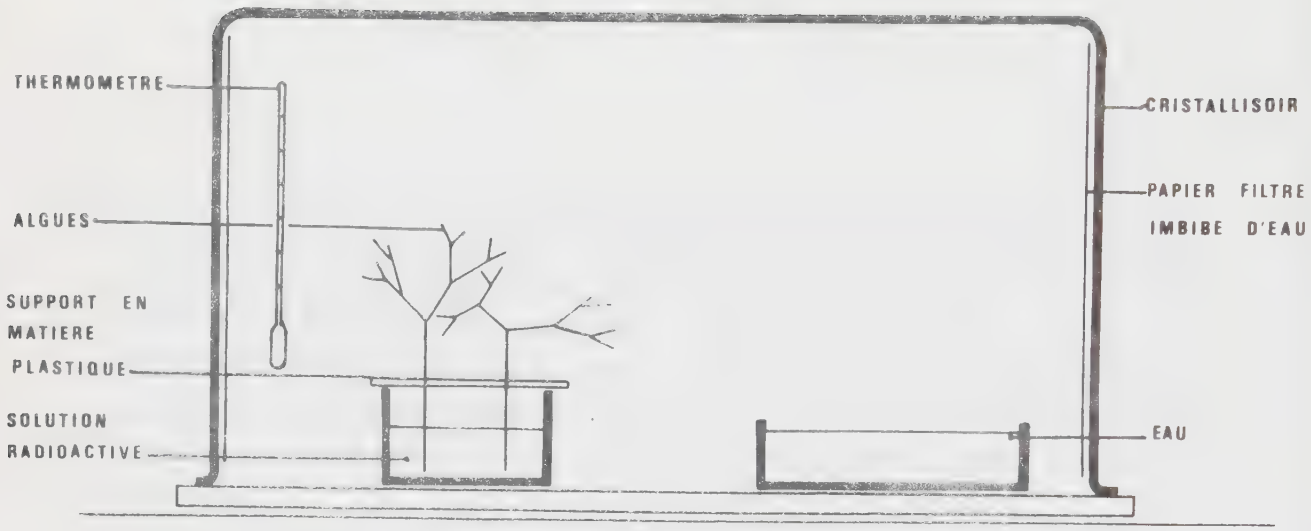


Fig. 27.- Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience d'absorption de citrulline radioactive.

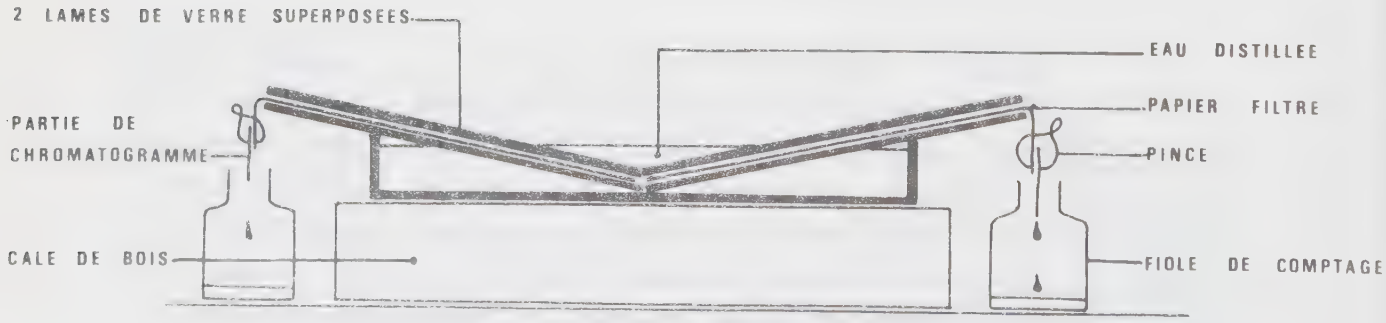


Fig. 28.- Dispositif expérimental utilisé pour l'élution des acides aminés marqués.

de substance marquée.

- Le fait de laisser l'appareil végétatif entier, ou tout au moins la plus grande partie de celui-ci, à l'extérieur de la solution à absorber, active la transpiration et favorise l'absorption par le végétal. Si ces conditions s'écartent de celles, naturelles, réalisées lorsque l'Algue est immergée, elles se rapprochent beaucoup de l'état, également naturel, dans lequel la plante se trouve à marée basse, alors qu'elle est complètement émergée.

- Les manipulations des Algues, et en particulier leur rinçage après l'absorption, sont beaucoup plus simples, les parties du thalle qui se sont trouvées au contact de la solution radioactive pouvant être éliminées aussitôt après l'absorption.

Un dispositif expérimental de ce genre a donc été retenu pour faire absorber la solution de citrulline marquée à *Polysiphonia lanosa* (Fig. 27).

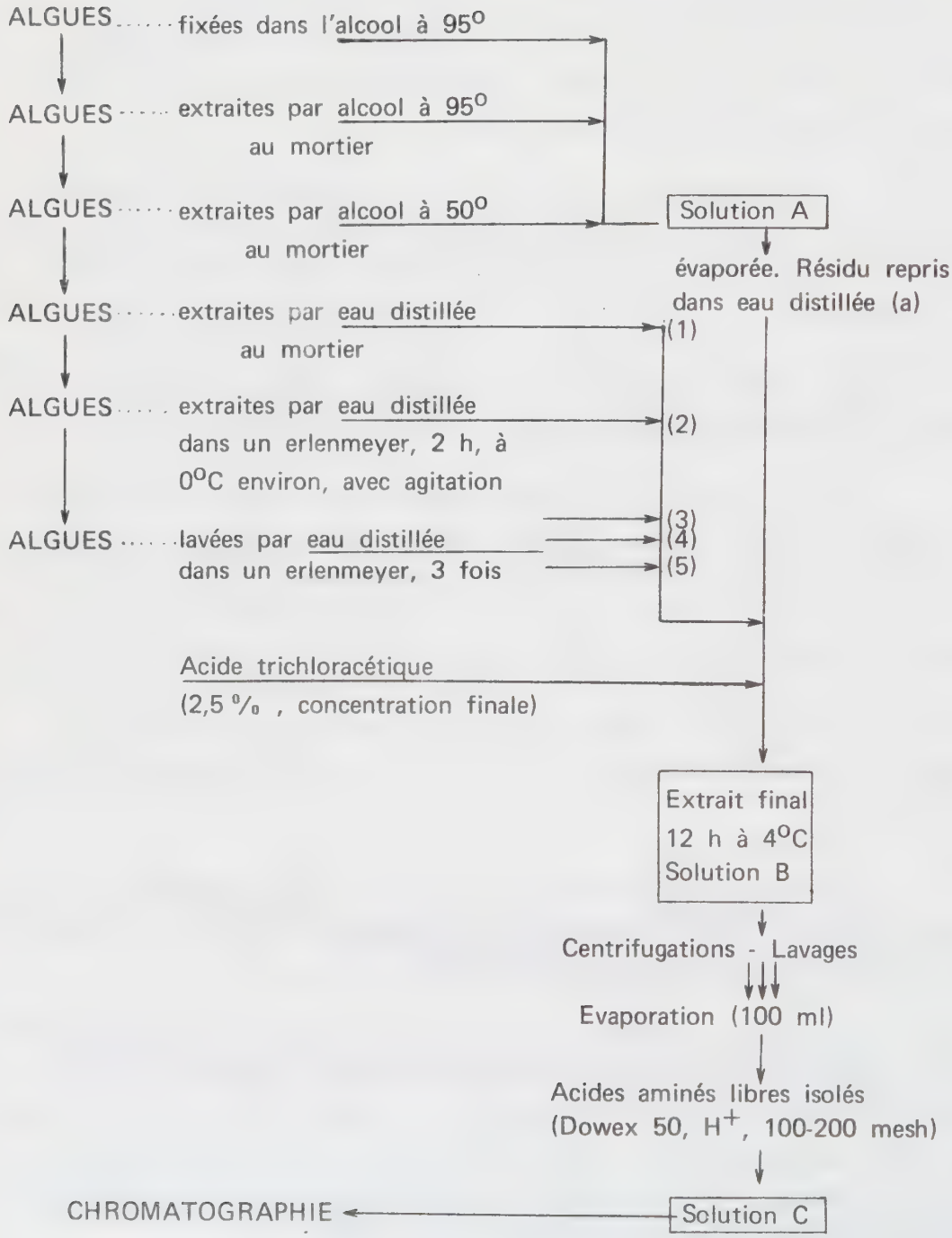
Les échantillons sont préparés comme pour les absorptions d'ornithine et d'arginine. On pèse alors 2 g environ de *Polysiphonia lanosa,* et on dispose les différents individus dans les trous d'une grille de matière plastique, de telle manière que la base des "tiges" plonge de cinq millimètres environ dans l'eau de mer stérile (3 ml) placée dans la coupelle. Cette eau contient 15 µM de citrulline. On y rajoute 0,1 millilitre de citrulline radioactive, qui apporte une activité de 15 µCi. Les coupelles sont placées dans une enceinte saturée d'humidité, à l'obscurité. La température pendant toute la durée des différentes absorptions est de $16^{o}C \pm 1$.

A la fin de l'expérience, les thalles sont sectionnés au ras de la surface supérieure du support de matière plastique ; ainsi, les parties prélevées n'ont pas baigné dans la solution radioactive.

Les Algues sont placées sur un entonnoir bouché par un tampon de laine de verre, puis rincées abondamment à l'eau de mer stérile et à l'eau distillée qui, en fin de lavage, ne présente plus la moindre radioactivité. Elles sont alors fixées par ébullition dans l'éthanol à 95^{o}, pendant 15 minutes, dans un erlenmeyer. Elles sont ensuite placées au congélateur, dans le liquide de fixation, jusqu'au moment de l'extraction des acides aminés libres.

TABLEAU XXVII

Technique d'extraction des acides aminés libres pour l'étude des composés radioactifs



Pour réaliser cette extraction (Tableau XXVII), les Algues sont broyées dans un mortier, dans de l'éthanol à 95°, puis de l'éthanol à 50°. Le liquide de fixation et ces deux extraits alcooliques (solution A) sont évaporés à l'évaporateur rotatif, et le résidu est repris par de l'eau distillée (a).

Le broyat est extrait une nouvelle fois par de l'eau distillée. L'extrait (1) est récupéré, et les Algues sont transvasées quantitativement du mortier dans un erlenmeyer. Elles sont remises en suspension dans de l'eau distillée, puis agitées deux heures sur un agitateur magnétique, dans un bain de glace fondante. Cet extrait (2) est ajouté au premier (1). Les Algues sont alors lavées trois fois consécutives par de l'eau distillée et les solutions obtenues (3, 4 et 5) sont ajoutées aux deux autres (1 et 2). Les extraits réunis (a, 1, 2, 3, 4 et 5) dans un erlenmeyer sont placés sur un agitateur magnétique, dans un bain de glace fondante et, sans interrompre l'agitation, on ajoute de l'acide trichloracétique cristallisé jusqu'à ce que la concentration de cet acide soit égale à 2,5 %. On laisse douze heures au réfrigérateur, pour obtenir une précipitation complète des protéines (solution B).

La solution B est ensuite centrifugée, et les culots lavés plusieurs fois à l'eau distillée. Après évaporation jusqu'à un volume de 100 millilitres environ, les acides aminés libres de cette solution sont fixés sur une colonne de résines DOWEX 50, forme H^+ (100-200 mesh). Ces acides aminés sont élués et chromatographiés suivant les techniques habituelles, pour obtenir des autoradiogrammes d'une part, et effectuer les comptages des activités des aminoacides marqués d'autre part.

Les taches des acides aminés radioactifs, détectés au préalable sur des chromatogrammes témoins, sont éluées (Fig. 28). L'éluat est recueilli directement dans les fioles de comptage. Après évaporation, le résidu sec est remis en solution dans le mélange scintillant, et les fioles sont placées dans le compteur à scintillation liquide NUCLEAR CHICAGO. Les résultats sont exprimés en activités (coups par minute) pour cent milligrammes de poids sec.

2. - Résultats et commentaires

Lorsque l'on fournit de la citrulline marquée à *Polysiphonia lanosa*, l'analyse de la fraction aminée libre, après des temps d'absorption variables, permet

TABLEAU XXVIII

Radioactivité de différents acides aminés libres, après absorption de citrulline marquée (en coups par minute, pour 100 mg de poids sec)

Acides aminés	Valeurs des activités (c/mn/100 mg sec) après des durées d'absorption de				
	1 h	2 h	5 h	12 h	24 h
Citrulline	33 713	53 593	43 376	43 104	42 699
Ornithine	1 106	1 979	978	1 125	1 692
Arginine	688	2 446	1 470	897	1 253
Acide glutamique	103	394	485	1 282	1 369
Proline	469	845	1 139	1 695	3 070
Composé inconnu	0	42	26	406	86
T O T A U X	36 079	59 299	47 474	48 519	50 169

de déceler la radioactivité dans la citrulline, l'ornithine, l'arginine, l'acide glutamique, la proline et un composé inconnu (Tableau XXVIII ; Fig. 29, 30 et 31).

L'activité totale des acides aminés libres augmente rapidement pendant les deux premières heures de l'expérience, diminue fortement entre la deuxième et la cinquième heure, puis augmente à nouveau ensuite, très lentement. Les valeurs du marquage de la citrulline subissent une évolution parallèle à celle de l'activité totale, pendant les cinq premières heures, mais baissent progressivement par la suite. La quasi-totalité de la radioactivité des acides aminés libres est due, au départ, à la citrulline absorbée. Mais après 24 heures, l'activité de cet aminoacide diminue, et celle des autres acides aminés augmente (Fig. 29).

La chute des valeurs de la radioactivité constatée entre la deuxième et la cinquième heure d'expérience, puisque les échantillons étaient rigoureusement comparables, doit correspondre au passage d'une certaine quantité de carbone 14 dans des composés autres que les acides aminés libres, probablement des acides organiques, des glucides ou des peptides. Pendant les deux premières heures, les phénomènes d'absorption et d'accumulation de la citrulline sont donc prédominants. Après ce délai, une "saturation" de la fraction azotée soluble en citrulline semble intervenir, et les processus métaboliques deviennent alors plus importants.

La citrulline est donc absorbée et métabolisée par l'Algue. Mais l'activité métabolique de la Rhodophycée, concernant les acides aminés libres, paraît faible, car seulement une proportion réduite de la radioactivité de la citrulline passe dans les molécules des autres acides aminés.

Dès le début de l'absorption de la citrulline marquée, les activités les plus importantes dérivant de celles de cet aminoacide, se retrouvent dans l'ornithine et l'arginine respectivement. Ce fait, comme l'évolution parallèle des valeurs de la radioactivité de ces deux composés, montrent bien que l'ornithine et l'arginine, chez *Polysiphonia lanosa* comme chez d'autres organismes, sont en relation étroite avec la citrulline dans le métabolisme des acides aminés libres. Le plus fort marquage présenté par l'ornithine dès la première heure d'absorption peut faire penser que cet acide aminé est relié plus tôt à la citrulline que ne l'est l'arginine. Mais l'augmentation rapide des valeurs de la radioactivité de l'arginine pendant les deux premières heures de l'expérience peut aussi être l'indice d'un lien direct entre ce composé et la citrulline. Toutefois, ces faits peuvent cor-

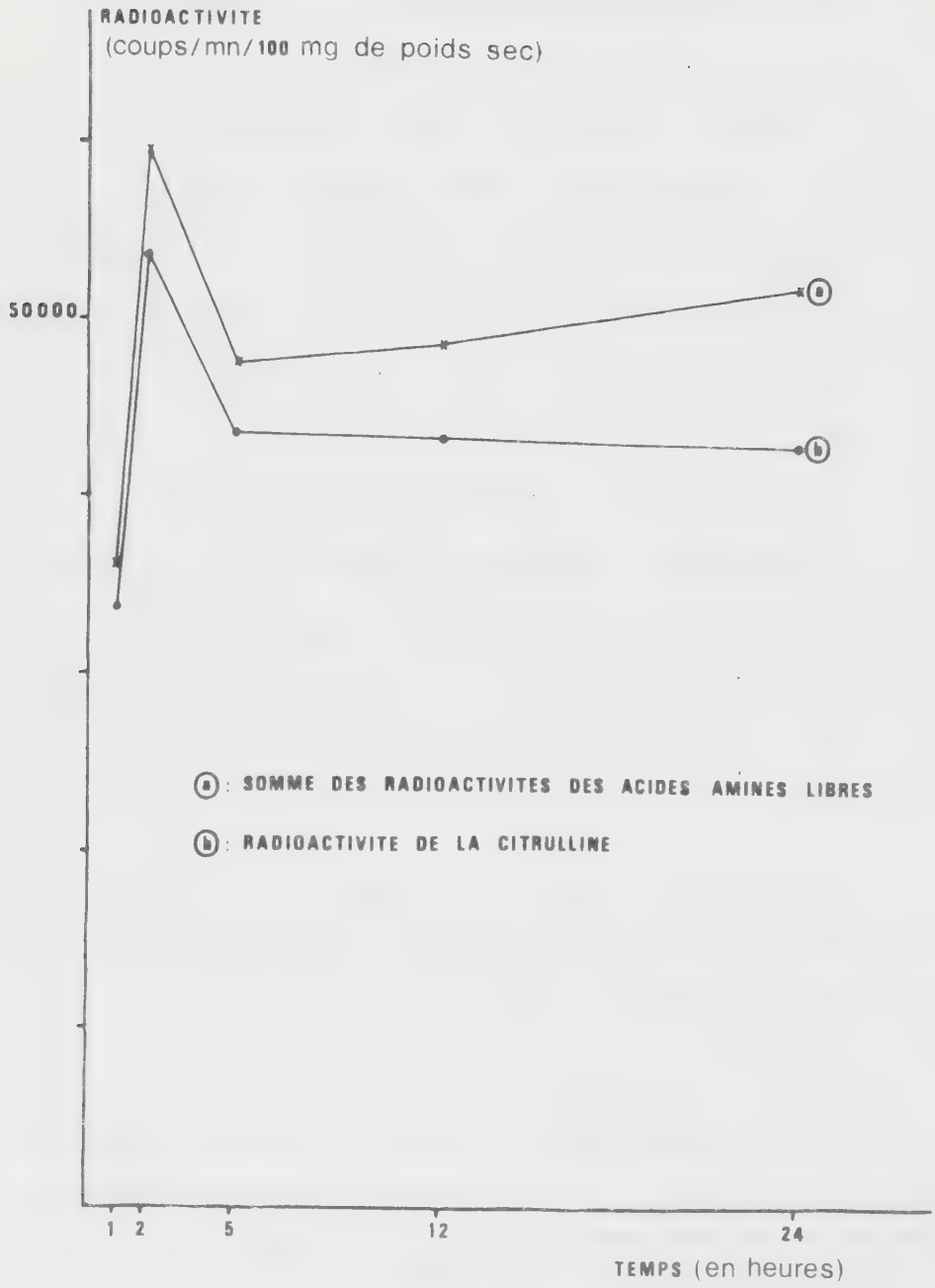


Fig. 29.- Evolution, au cours du temps, des valeurs de la radioactivité totale des acides aminés libres et de la radioactivité de la citrulline libre, chez *Polysiphonia lanosa,* après absorption de citrulline radioactive.

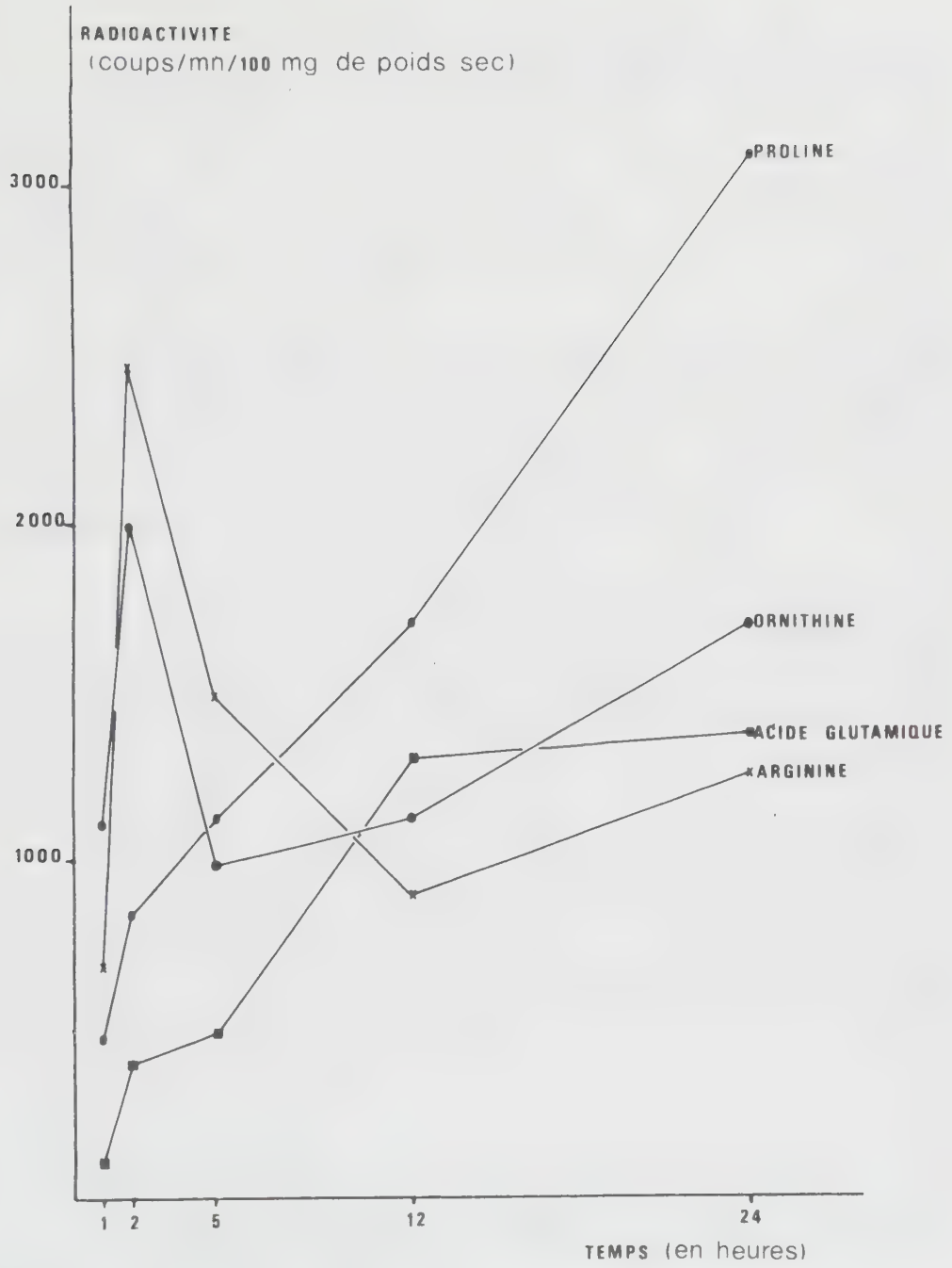


Fig. 30.- Evolution, au cours du temps, des valeurs de la radioactivité de différents acides aminés libres, chez *Polysiphonia lanosa* après absorption de citrulline marquée.

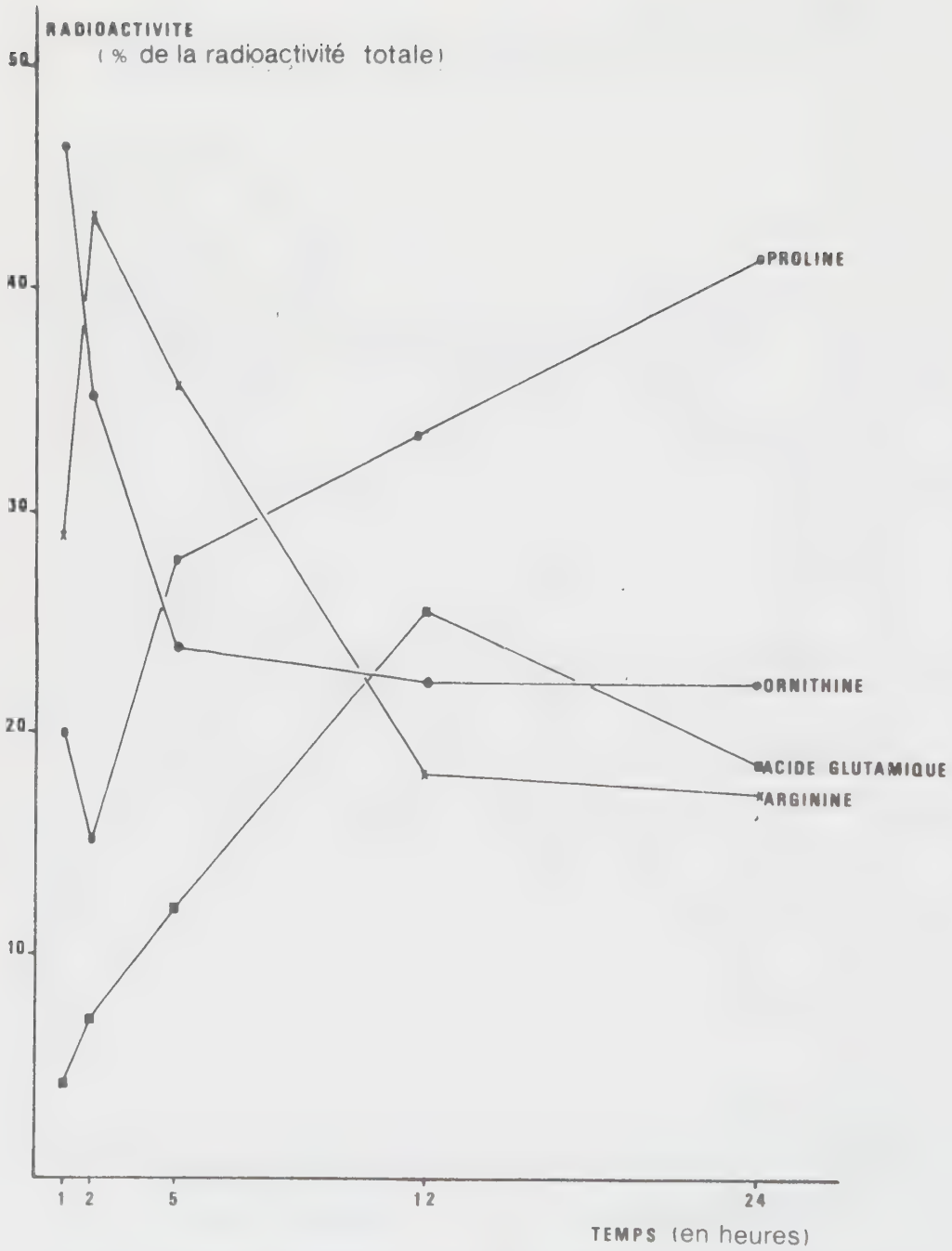


Fig. 31.- Evolution, au cours du temps, des valeurs de la radioactivité de différents acides aminés libres, en pourcentages de la valeur de la radioactivité totale des acides aminés libres (valeurs de la citrulline exclues), chez *Polysiphonia lanosa* après absorption de citrulline marquée.

respondre à des possibilités réactionnels différentes pour l'ornithine et l'arginine. En outre, la forte concentration de citrulline libre peut expliquer, dans une certaine mesure, une accumulation d'ornithine au début de l'absorption. La synthèse de citrulline, à laquelle participe l'ornithine, peut en effet se trouver ralentie par l'abondance de la citrulline dans le milieu. Mais le fonctionnement parallèle des voies métaboliques qui mènent, par l'intermédiaire de la semialdéhyde glutamique, d'une part à l'acide glutamique, et d'autre part à la proline, permet ensuite l'utilisation rapide de cette ornithine.

L'acide glutamique paraît très peu marqué au début de l'expérience. Puis son activité augmente rapidement jusqu'à la douzième heure d'absorption et demeure à peu près stable ensuite. Cette évolution peut marquer le fait que cet acide aminé se trouve en dehors du cycle de l'ornithine, et qu'il ne constitue probablement qu'un terme de passage vers d'autres composés.

La radioactivité de la proline croît rapidement, pendant toute la durée de l'expérience. Cela peut correspondre au fait que cet acide aminé, comme la citrulline, peut se rencontrer en concentrations assez fortes dans la fraction aminée libre de *Polysiphonia lanosa,* sans être immédiatement repris dans le métabolisme.

Au terme de cette expérience d'absorption de citrulline marquée, le lien qui unit cet aminoacide à l'ornithine et à l'arginine n'apparaît pas clairement. La liaison se fait-elle d'abord entre la citrulline et l'arginine, comme dans le cycle classique, ou entre la citrulline et l'ornithine ? La recherche des enzymes impliquées dans ces transformations possibles de la citrulline et de l'arginine pouvait apporter une réponse à cette question.

B. - ETUDE ENZYMATIQUE

La molécule de citrulline peut subir des transformations qui aboutissent :

- à l'arginine, par l'intermédiaire de l'acide argininosuccinique, produit de condensation dont la formation nécessite la présence d'acide aspartique et d'ATP (RATNER, 1954).

- à l'ornithine, en présence d'ADP (OGINSKY, 1955).

- à d'autres acides aminés, par transaminations (TOUZE, 1964).

1. - Etude des enzymes

Les techniques utilisées pour l'extraction des protéines enzymatiques sont les mêmes que celles qui ont été décrites au chapitre précédent (voir page 121). La présence de l'arginine synthétase, de la citrullinase et des transaminases a été recherchée successivement dans ces extraits.

a. - L'arginine synthétase

La synthèse de l'arginine à partir de la citrulline peut être catalysée par l'arginine synthétase, lorsque de l'acide aspartique, de l'ATP et des ions Mg^{++} sont présents dans le milieu (RATNER, 1955).

En fait, la réaction se fait en deux temps. Au terme du premier se forme un composé intermédiaire, l'acide arginino-succinique. Ce dernier se scinde ensuite en arginine et acide fumarique, en présence de l'enzyme de scission.

$$\text{citrulline} + \text{acide aspartique} + \text{ATP} \xrightarrow[\textit{condensante}]{\textit{enzyme}} \text{acide arginino-succinique}$$

$$\text{acide arginino-succinique} \xrightarrow[\textit{de scission}]{\textit{enzyme}} \text{arginine} + \text{acide fumarique}$$

Ce système enzymatique a d'abord été décrit chez les animaux, puis il a été mis en évidence chez les végétaux (FOTYMA et coll., 1961). Je l'ai recherché chez *Polysiphonia lanosa,* suivant un protocole expérimental dérivé des travaux de ces auteurs et de ceux de TOUZE (1964).

TABLEAU XXIX

Protocole expérimental pour la mise en évidence de l'arginine synthétase (D'après FOTYMA et coll., 1961 et TOUZE, 1964)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate, pH 7,4	1,0 ml	1,5 ml
Citrulline 0,1 M, dans le tampon, pH 7,4	0,15 ml	-
Acide aspartique 0,1 M, dans le tampon, pH 7,4	0,15 ml	-
ATP 0,025 M, dans le tampon, pH 7,4	0,10 ml	-
$MgSO_4$, 7 H_2O 0,066 M, dans le tampon, pH 7,4	0,10 ml	-
Extrait enzymatique (150 µg de protéines) dans le tampon, pH 7,4	0,5 ml	0,5 ml

La durée de l'expérience est de deux heures, à la température de 38°C. L'arrêt de la réaction et les dilutions se font comme pour l'étude de l'arginase (voir page 122). Puis l'arginine et la citrulline sont dosées sur des fractions aliquotes des solutions, selon les techniques habituelles.

b. - La citrullinase

La citrullinase, ou citrulline phosphorylase, intervient pour catalyser la transformation de la citrulline, en présence de phosphate, d'ADP ou d'AMP et d'ions Mg^{++}, en ornithine, gaz carbonique, ammoniac et adénosine triphosphorique.

$$\text{citrulline} + H_3PO_4 + \text{ADP} \xrightarrow[\textit{citrullinase}]{Mg^{++}} \text{Ornithine} + CO_2 + NH_3 + \text{ATP}$$

Le phosphate, l'ADP (ou AMP) et les ions Mg^{++}peuvent être remplacés par de l'arséniate, qui provoque une arsénolyse très rapide. L'ornithine, produit de la réaction, est inhibitrice. L'inhibition est plus sensible avec le phosphate qu'avec l'arséniate (OGINSKY, 1955).

TABLEAU XXX

Protocole expérimental pour la mise en évidence de la citrullinase (D'après OGINSKY, 1955)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate, pH 6,2	1,0 ml	2,3 ml
Citrulline 0,1 M, dans le tampon, pH 6,2	0,2 ml	-
AMP 0,01 M, dans le tampon, pH 6,2	0,5 ml	-
$MgCl_2$, $6H_20$ 0,1 M, dans le tampon, pH 6,2	0,1 ml	-
PO_4H_2K 0,1 M, dans le tampon, pH 6,2	0,5 ml	-
Extrait enzymatique (400 µg de protéines) dans le tampon, pH 6,2	0,5 ml	0,5 ml

L'expérience est réalisée au WARBURG, avec des fioles à deux diverticules latéraux. Dans l'un on introduit de la citrulline et dans l'autre de l'acide sulfurique 2 N (0,2 ml), qui n'est ajouté au milieu réactionnel qu'en fin de manipulation, pour provoquer le dégagement du CO_2 retenu. On opère en atmosphère d'azote. La durée de l'expérience est de deux heures, à la température de 38°C.

c. Les transaminases

La citrulline peut participer à des réactions plus générales que celles qui sont strictement liées au cycle de KREBS et HENSELEIT, aux transaminations par exemple. Il est possible en effet que sa molécule cède un radical-NH_2 qui peut être transféré sur un acide cétonique par l'intermédiaire d'une transaminase (TOUZE, 1964). Il était intéressant de vérifier si un tel système existait chez *Polysiphonia lanosa.*

TABLEAU XXXI

Protocole expérimental pour la mise en évidence des transaminases (D'après JACOBI, 1957)

	Essai	Témoin
Tampon phosphate, pH 8,4	1,2 ml	1,5 ml
Citrulline 0,5 M dans le tampon, pH 8,4	0,1 ml	-
Acide cétonique 0,5 M, dans le tampon, pH 8,4	0,1 ml	-
Pyridoxalphosphate 0,006 M dans le tampon, pH 8,4	0,1 ml	-
Extrait enzymatique (100 µg de protéines) dans le tampon, pH 8,4	0,5 ml	0,5 ml

Les expériences ont été entreprises pendant des durées de 4 à 18 heures, à la température de 38°C. La réaction est arrêtée dans la glace fondante, et chaque milieu est immédiatement analysé par chromatographie sur plaques minces (gel de silice KIESELGEL G, MERK ; solvant : méthanol - eau, 60 : 40). Les acides cétoniques utilisés étaient l'acide pyruvique et l'acide oxaloacétique. Ces deux acides alpha-cétoniques sont très souvent employés dans les travaux concernant les transaminases, car ils constituent d'excellents accepteurs du groupement aminé, et mènent à la synthèse de deux acides aminés largement répandus chez les Algues marines, l'alanine et l'acide aspartique.

2. - Résultats

Il n'a jamais été possible de mettre en évidence une activité de l'arginine synthétase, de la citrullinase ni des transaminases, à l'aide de sources enzymatiques brutes (poudres sèches, poudres acétoniques ou extraits de thalles frais) ou de préparations enzymatiques plus ou moins purifiées par filtration sur colonnes de Sephadex, obtenues à partir de *Polysiphonia lanosa.*

Conclusion : Ces différentes études, celles des enzymes exceptées, montrent que la citrulline peut être réutilisée dans le métabolisme des acides aminés libres de *Polysiphonia lanosa.* Toutefois, les voies de son utilisation n'apparaissent pas clairement, et semblent peu actives. L'impossibilité de mettre en évidence l'arginine synthétase ne signifie pas que la séquence citrulline-arginine soit absente ; le fait que l'arginine soit marquée après absorption de citrulline ou d'ornithine radioactive est un argument en faveur de sa présence. Mais le passage citrulline-ornithine est peut-être également possible et d'autres liens que celui qui est indiqué par l'arginase pourraient exister entre l'arginine et l'ornithine (NAYLOR, 1959 ; CHAMPIGNY, 1960).

En dehors du cycle de l'ornithine proprement dit, il est une voie métabolique qui ressort nettement de ces études d'absorption d'acides aminés marqués, et que l'on retrouve chez différents organismes vivants. C'est celle qui relie les acides aminés du cycle de l'ornithine à la proline, et qui passe par l'intermédiaire de la semi-aldéhyde glutamique. Cette relation, comme la dérivation vers l'acide glutamique, indique des possibilités de réutilisation de la citrulline par *Polysiphonia lanosa.*

CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

Cette étude a permis de préciser quelques points du métabolisme de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa.*

En ce qui concerne la synthèse de la citrulline :

- Les expériences d'absorption d'acides aminés non marqués ont montré que si de l'arginine est fournie à l'Algue, les quantités d'ornithine et d'acide glutamique augmentent dans la fraction aminée libre. Si ce Thallophyte dispose d'ornithine, la concentration de l'acide glutamique s'élève également. Dans l'un et l'autre cas, la quantité de citrulline libre s'accroît.

- L'expérience d'absorption d'ornithine radioactive montre que l'ornithine, la citrulline, l'arginine, l'acide glutamique et la proline, essentiellement, sont marqués lorsque cet acide est fourni à *Polysiphonia lanosa.* La plus forte radioactivité se retrouve, en dehors de l'ornithine, dans la citrulline et la proline.

Ces résultats prouvent que *Polysiphonia lanosa* est capable d'absorber de l'ornithine et de l'arginine exogènes et de les métaboliser. Cette Rhodophycée se comporte, à cet égard, comme d'autres Algues marines et dulçaquicoles qui peuvent utiliser différents acides aminés. Mais les résultats diffèrent suivant les expérimentateurs. Par exemple, lorsque de l'arginine est ajoutée au milieu de culture d'Acétabulaires, certains (BRACHET, 1958 ; PUISEUX-DAO, 1962) observent une forte toxicité pour ces Dasycladacées, et d'autres (CHAUDURI et SPENCER, 1968) constatent une absorption active et une forte accumulation de l'acide aminé dans la fraction azotée soluble des Algues.

BAKER et THOMPSON (1962) ont fait absorber de l'arginine à *Chlorella vulgaris* et ont obtenu une bonne utilisation de ce composé par la Chlorophycée. La citrulline, l'acide glutamique, l'alanine, la glutamine et la proline sont synthétisés très activement à la suite de cette absorption. En présence d'ornithine, les mêmes auteurs remarquent une augmentation du pool de l'acide glutamique et de l'alanine libres principalement, puis de l'arginine, de la citrulline et de la glutamine, mais d'une façon beaucoup moins importante. L'emploi d'ornithine et d'arginine marquées a permis à ces chercheurs de confirmer ces résultats.

L'entrée de l'ornithine et de l'arginine dans le métabolisme des acides aminés libres de *Polysiphonia lanosa* se traduit essentiellement par une augmentation des concentrations de la citrulline, de l'acide glutamique, de l'alanine et de la proline, résultats très proches de ceux de BAKER et THOMPSON. L'emploi de l'ornithine radioactive a apporté une preuve supplémentaire de l'absorption de la molécule de cet acide aminé par la Céramiale, chez qui elle est liée à la citrulline et à l'arginine libres. De plus, cette dernière expérience met en évidence les liens qui existent, chez *Polysiphonia lanosa,* entre l'ornithine et l'acide glutamique d'une part, et entre l'ornithine et la proline d'autre part.

- Les études qui se rapportent aux enzymes impliquées dans la synthèse de la citrulline montrent que la mise en évidence des activités enzymatiques est très difficile chez *Polysiphonia lanosa.* Les fractions protéiques actives sont quantitativement très peu importantes dans les extraits. Toutefois, il ne semble pas que ces faibles concentrations de protéines soient la cause des activités très réduites ou nulles qui ont été constatées. En effet, des résultats quantitativement importants ont été acquis par plusieurs auteurs dans des conditions expérimentales analogues. Par exemple, LEVENBERG (1962), pour la mise en évidence de la transcarbamylase d'*Agaricus bisporus,* utilise des extraits enzymatiques contenant de 50 à 270 microgrammes de protéines par millilitre. DUNDAS et HALVORSON (1966), dans une étude consacrée à la même enzyme chez *Halobacterium salinum,* emploient des solutions de concentrations égales à cinq microgrammes de protéines par millilitre. TOCHER et MEUSE (1966), pour évaluer l'activité de la phénolase de la Chlorophycée *Monostroma fuscum,* réalisent des milieux d'incubation qui ne renferment que sept microgrammes de protéines...

L'arginase, l'uréase et l'ornithine transcarbamylase existent chez *Polysiphonia lanosa.* La présence d'arginase n'a encore jamais été signalée, à ma connaissance, chez les Algues marines. Celle de l'ornithine transcarbamylase a été décelée par REUTER (1961) chez quatre espèces méditerranéennes, et JACOBI (1962) rapporte une communication orale de REUTER, attestant l'existence d'une activité uréasique chez plusieurs Algues de la baie de Naples. L'uréase et l'arginase semblent absentes chez les Chlorelles (HATTORI, 1958-1960 ; WALKER, 1952), mais ALLISON et coll. (1954) pensent que l'uréase est présente chez *Nostoc muscorum,* bien qu'ils n'aient pu le démontrer, et BERNS et coll. (1966) ont prouvé que plusieurs Cyanophycées possèdent cette enzyme.

Ces recherches des enzymes qui interviennent dans la synthèse de la citrulline chez *Polysiphonia lanosa* confirment une partie des résultats acquis chez cette Céramiale, en particulier par l'absorption d'ornithine marquée. Ces expériences prouvent l'existence des séquences arginine-ornithine et ornithine-citrulline chez ce Thallophyte. Mais elles montrent aussi que les extraits contiennent, en plus des protéines inactives (les chromoprotéines en particulier) qui constituent quantitativement la fraction la plus importante des solutions, une ou plusieurs substances inhibitrices.

En ce qui concerne l'utilisation métabolique de la citrulline :

- L'absorption de citrulline marquée montre que cet acide aminé est absorbé par l'Algue et que sa dégradation conduit principalement à l'ornithine, l'arginine, l'acide glutamique et la proline. BAKER et THOMPSON (1962) observent, après absorption de citrulline par *Chlorella vulgaris,* une augmentation importante des concentrations de l'acide glutamique et de l'alanine essentiellement. La proline, la glutamine et l'arginine augmentent également, mais dans des proportions moindres.

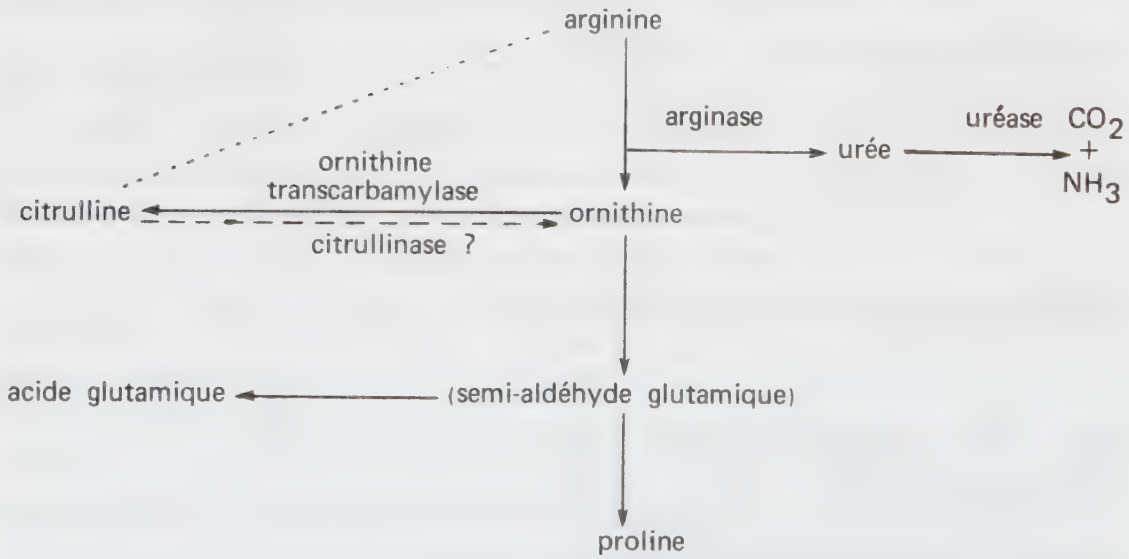
Ces transformations de la molécule de citrulline dans le métabolisme des acides aminés libres de *Polysiphonia lanosa* mettent en évidence des faits identiques à ceux qui ont été observés chez de nombreux autres végétaux. En particulier, une relation existe entre cet acide aminé, l'ornithine et l'arginine (cycle de l'ornithine ?), puis entre la citrulline et l'acide glutamique et enfin entre la citrulline et la proline. La semi-aldéhyde glutamique doit constituer, chez cette Algue rouge comme chez d'autres organismes (BARET et coll., 1966), la "plaque tournante" située entre l'ornithine d'une part, et l'acide glutamique ou la proline d'autre part.

- L'étude des enzymes impliquées dans les différentes voies de réutilisation de la citrulline ne permet pas de définir les mécanismes qui interviennent chez ce Thallophyte. Un métabolisme très peu actif, ainsi que l'impossibilité d'obtenir, par les méthodes employées, des extraits enzymatiques complètement débarrassés des inhibiteurs qu'ils contiennent, semblent les principales causes de ces résultats négatifs.

Les expériences réalisées ne peuvent donc fournir aucune preuve qui indique le sens de la transformation de la citrulline. Toutefois, le fait que le

passage arginine ⟶ ornithine ⟶ citrulline ait pu être reconnu, laisse penser, par analogie avec ce qui se passe chez d'autres organismes, que la séquence citrulline ⟶ arginine peut également prendre place chez *Polysiphonia lanosa.* Mais cela n'est pas une certitude. **L'arginine synthétase peut manquer** dans l'équipement enzymatique de ce Thallophyte. Cette absence pourrait expliquer, dans une certaine mesure, l'accumulation de la citrulline dans la fraction aminée libre. Mais l'Algue est quand même capable de réutiliser l'aminoacide, peut-être par l'intermédiaire de la citrullinase.

Au terme de cette étude il est possible de réaliser le schéma suivant qui rend compte de ce qui a pu être établi par les différents résultats obtenus. Les flèches en traits pleins indiquent les voies métaboliques pour lesquelles des preuves expérimentales ont été acquises. Les tirets désignent une dégradation possible de la citrulline, catalysée par la citrullinase. Les pointillés correspondent à la voie métabolique qui existe dans le cycle de KREBS et HENSELEIT normal, mais aucun résultat expérimental ne permet d'affirmer la présence de cette voie chez *Polysiphonia lanosa.*



Il resterait à situer ce métabolisme de la citrulline dans le métabolisme général des acides aminés de *Polysiphonia lanosa.* Les expériences réalisées avec l'ornithine et la citrulline radioactives indiquent certaines de ces relations,

notamment avec l'acide glutamique et la proline.

L'accumulation de la citrulline par la plante n'est pas expliquée, si ce n'est par l'absence possible de l'arginine synthétase. De toute façon, la réutilisation de ce composé semble limitée. Toutefois, il est possible que dans certaines conditions physiologiques, lorsque l'Algue se trouve dans un milieu nutritif appauvri, ou pendant les périodes d'émersion, un rôle de réserve azotée de l'aminoacide se découvre.

Une étude en culture pure permettrait de préciser ces points qui demeurent incertains : le passage de la citrulline à l'arginine, l'accumulation importante de citrulline. La croissance prolongée en présence de citrulline, arginine ou ornithine fournirait certainement des renseignements intéressants. L'apport d'éléments reconnus responsables, par leur carence, d'accumulation d'acides aminés chez d'autres végétaux, conduirait peut être à une utilisation normale de la citrulline par *Polysiphonia lanosa*. **Mais il n'est pas exclu que cette physionomie particulière du métabolisme azoté de cette Rhodophycée soit liée, non pas à des conditions nutritives "défavorables", mais à une structure génétique spécifique. Dans ce cas, l'accumulation de la citrulline n'aurait pas de signification métabolique précise.**

CONCLUSIONS GENERALES

Au sein des Thallophytes, les Algues marines constituent un groupe original qui représente un vaste champ de recherches. Mais la grande diversité des caractères morphologiques, anatomiques et biologiques de ces végétaux est un premier obstacle à leur étude. En particulier, la constitution d'échantillons qui puissent être définis avec précision par ces caractères comporte toujours une part d'incertitude, par suite d'un manque d'homogénéité.

Un échantillon réalisé d'après des critères de date et de lieu de récolte, de taille, de nombre d'individus et de stade de développement essentiellement, permet néanmoins d'obtenir des valeurs moyennes, représentatives d'une espèce dans ces conditions bien précises, et comparables à celles acquises de la même manière chez d'autres Algues. L'étude de la composition azotée des Algues marines les plus communes des côtes Nord de la Bretagne a été entreprise sur la base d'un tel échantillonnage.

Les traits caractéristiques de cette composition sont des teneurs d'azote assez élevées, principalement pour les Chlorophycées et les Rhodophycées. Les composés insolubles (protéines surtout) constituent en moyenne 70 % environ de la fraction azotée totale des Algues analysées. La composition en acides aminés de la fraction protéique totale paraît assez homogène. Chlorophycées, Phéophycées et Rhodophycées ne semblent pas se différencier nettement à cet égard ; quantitativement toutefois, chaque espèce conserve son individualité.

La fraction aminée libre est dominée de façon très nette par l'acide glutamique et l'alanine. Les amides, que l'on a cru absentes chez les Algues marines pendant longtemps, y sont représentées d'une manière générale, quoique en concentrations assez faibles, sauf chez les Chlorophycées. Les Algues vertes sont caractérisées par les amides et l'acide glutamique, les brunes par l'alanine et l'acide glutamique et les rouges par l'acide glutamique, la citrulline et la proline. Chacune de ces classes a donc une physionomie particulière. Au niveau des espèces, certains acides aminés libres, la citrulline, la proline, la méthionine, la lysine, prennent parfois une importance qualitative (la citrulline n'a été reconnue

que chez les Rhodophycées) et surtout quantitative remarquable. Il est alors facile d'individualiser les Algues qui se distinguent ainsi. Mais parfois la fraction aminée libre est dominée (quantitativement) par un acide aminé banal, comme l'acide glutamique ou l'alanine. Ces accumulations d'acides aminés divers peuvent être l'indice de métabolismes particuliers, et donc permettre de remarquer les espèces les plus intéressantes pour faire l'objet d'une étude plus précise.

C'est ainsi que la forte concentration de citrulline dans la fraction aminée libre de quelques espèces m'a incité à étudier le métabolisme de cet aminoacide chez une Céramiale, *Polysiphonia lanosa*. Des techniques variées ont dû être utilisées pour obtenir les résultats qui ont permis de mettre en évidence certains aspects du métabolisme de la citrulline chez cette espèce. De grandes difficultés sont apparues lors de l'étude enzymatique qui, d'une façon générale, est très délicate au niveau des Algues marines. La purification, par filtration sur colonne de Séphadex, s'est révélée nécessaire pour débarrasser les extraits de protéines totales de composés inhibiteurs, au moins partiellement, et obtenir des résultats positifs pour les activités arginasique, uréasique et ornithine transcarbamylasique. A la lumière de toutes les données acquises, la synthèse de la citrulline a lieu, comme chez d'autres végétaux, à partir de l'ornithine, qui peut dériver elle-même de l'arginine. Mais la réutilisation de la citrulline par la plante, constatée sans ambiguité par l'utilisation de citrulline radioactive, se fait par des mécanismes qu'il n'a pas été possible de préciser avec certitude. De plus, cette réutilisation semble limitée. L'arginine et l'ornithine se trouvent sur les voies de cette réutilisation.

Cette étude a aussi confirmé le lien métabolique qui existe entre la citrulline et l'acide glutamique d'une part, et la citrulline et la proline d'autre part. Cette dernière voie métabolique est, chez *Polysiphonia lanosa,* assez active, car la proline est toujours quantitativement bien marquée après absorption d'ornithine ou de citrulline radioactives.

Ces quelques résultats ne sont qu'une introduction à l'étude du métabolisme azoté des Algues marines. Ils permettent d'orienter les travaux à venir, en indiquant certaines espèces favorables à des recherches portant sur un problème précis. Mais ces premières données biochimiques devront être complétées, en particulier par l'étude des peptides, qui semblent posséder chez les Algues marines une importance physiologique, biologique et peut être taxonomique. Les protéines, toujours très peu connues, devront faire l'objet d'un travail de détail,

après purification et fractionnement.

La recherche des enzymes de ces végétaux marins sera l'indispensable complément à celle des métabolismes particuliers, et mènera à une meilleure connaissance de la physiologie de ces Thallophytes.

Il paraît nécessaire d'avoir recours aux techniques de cultures pures au laboratoire pour aborder ces différents problèmes d'une manière efficace, car la récolte des Algues sur le terrain pose trop de problèmes délicats et difficiles à résoudre d'une façon absolument satisfaisante.

BIBLIOGRAPHIE

ABDEL-FATTAH, A.F. et **HUSSEIN, M.M., 1970.**- Composition of some brown algae as influenced by seasonal variation. *Phytochem., 9,* 721-724.

AIRTH, R.L., 1955.- The phycobilins pigments from *Porphyra naiadum.* Ph. D. Thesis. Stanford Univ. California.

ALFIMOV, N.N., 1963.- "Matériaux pour la biochimie de quelques macrophytes de la Mer Noire" (en Russe). *Bot. Zh., S.S.S.R., 48,* 132-135.

ALLISON, R.K., SKIPPER, H.E., REID, M.R., SHORT, W.A. et **HOGAN, G.C., 1954.**- Studies on the photosynthetic reaction. II. Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum. Plant physiol., 29,* 164-168.

ANDERSON, J.W., 1968.- Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem., 7,* 1973-1988.

ARCHIBALD, R.M., 1944.- Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem., 156,* 121-142.

ARNOW, P., OLESON, J.J. et **WILLIAMS, J.H., 1953.**- The effect of arginine of the nutrition of *Chlorella vulgaris, Am. J. Bot., 40,* 100-104.

AUGIER, H., 1965.- Les substances de croissance chez la Rhodophycée *"Botryocladia botryoides"* (Wulf.) J. Feldm.. *C.R. Acad. Sci., 260,* 2304-2306.

AUGIER, J., 1947.- Les glucides et la systématique des Rhodophycées. *C.R. Acad. Sci., 224,* 1654-1656.

1953.- La constitution chimique de quelques Floridées Rhodomélacées. *Rev. Gén. Bot., 60,* 257-284.

1965.- Biochimie et taxinomie chez les Algues. *Bull. Soc. Bot. Fr., mémoire,* 8-15.

AUSTIN, A.P., 1960.- Observations on the growth, fruiting and longevity of *Furcellaria fastigiata* (L.) Lam. *Hydrobiologia, 15,* 193-207.

BAARDSETH, E., 1970.- Seasonal variation in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. in the Trondheimsfjord, with respect to the absolute live and dry weight and the relative contents of dry matter, ash and fruit bodies. *Bot. mar., 13,* 13-22.

BAARDSETH, E. et **HAUG, A., 1953.**- Individual variation of some constituents in brown algae and the reliability of analytical results. *Norv. Inst, of Seaweeds Res., Report n^{o} 2.*

BADRAN, A.M. et **JONES, D.E., 1965.**- Preparation of enzymes from plant tissues containing high molecular weight polyphenols. *Plant. Physiol., 40,* suppl. LXX.

BAKER, J.E. et **THOMPSON, J.F., 1961.**- Assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris. Plant Physiol., 36,* 208-212.

1962.- Metabolism of urea and ornithine cycle intermediates by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris. Plant Physiol., 37,* 618-624.

BARASHKOV, G.K., 1962.- "La chimie des Algues vertes" (en Russe). *Bot. Zh., S.S.S.R., 46,* 1825-1834.

BARASHKOV, G.K. et **VAKHRASHINA, A.V., 1965.**- "Teneur en substances azotées des Algues géantes de Mourmansk" (en Russe). *Prikl. Biokhim. Microbiol., S.S.S.R., 1,* 469-471.

BARASHKOV G.K., VAKHRASHINA, A.V. et **PETROV, Yu E., 1966.**- "Variations saisonnières dans la composition chimique de *Fucus* de la mer de Barents, péninsule de Kola" (en Russe). *Rast. Resursy, 2,* 191-200.

BARBER, J.T. et **BOULTER, D., 1963.**- Argininosuccinic acid in germinating seeds of *Vicia faba* L.. *Nature 197,* 1112.

BARET, R. et **MOURGUE, M., 1955.**- Action des cations bivalents sur la réactivation de l'arginase de *Canavalia ensiformis. C.R. Soc. Biol., 154,* 742-745.

BARET, R., MOURGUE, M. et **BROC, A., 1965.**- L'arginine. II. *Bull. Soc. Pharm. Marseille, 14,* 103-129.

1965.- L'arginine. III. *Bull. Soc. Pharm. Marseille, 14,* 171-181.

1966.- L'arginine. III (Suite). *Bull. Soc. Pharm. Marseille, 15,* 19-29.

1966.- L'arginine. IV. *Bull. Soc. Pharm. Marseille, 15,* 111-123.

1966.- Sur la spécificité de quelques désimidases. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 9,* 181-193.

BARET, R., MOURGUE, M. et **CHANCEL-GANDONNIERE, J., 1965.**- L'arginine. I. *Bull. Soc. Pharm. Marseille, 14,* 17-33.

BARNES, R.L., 1962.- Ornithine 2-^{14}C- metabolism in loblolly pine needles. *Forest Sci., 8,* 284-287.

BARNES, R.L. et **NAYLOR, A.W., 1959.**- Studies on the ornithine cycle in roots and callus tissues of *Pinus serotina* and *Pinus clausa. Bot. Gaz., 121,* 63-69.

1961.- Utilization of radioactive ornithine by germinating embryos of Longleaf and Slash Pines. *Forest Sci., 7,* 130-135.

BASTARD, C. et **PELLEGRINI, M., 1967.**- Contribution à l'étude chimique de *Rissoella verrucosa* (Bertolini) J. Agardh. *Qualitas Plant. et Materiae Veget., 15,* 123-135.

BEAUDRIMONT, R., 1960.- Influence d'un milieu riche en amino-acides sur les premiers stades du développement d'*Enteromorpha linza* (L.) J. Ag.. *Botaniste, 43,* 157-167.

BELMONT, L. et **MILLER, J.D.A., 1965.**- The utilisation of glutamine by Algae. *J. Exper. Bot., 16,* 318-324.

BERNFELD, P., BERKELEY, B.J. et **BIEBER, R.E., 1965.**- Reversible dissociation of enzymes at high dilution and their inhibition by polyanions. *Arch. Biochem. Biophys., 111,* 31-38.

BERNS, D.S., HOLOHAN, P. et **SCOTT, E., 1966.**- Urease activity in blue-green Algae. *Science, 152,* 1077-1078.

BLACK, W.A.P., 1948.- The seasonal variation in chemical constitution of some of the sublittoral seaweeds. *J. Soc. Chem. Ind., 67,* 165-176.

1948.- The seasonal variation in chemical composition of some of the littoral seaweeds common to Scotland. Part I. *Ascophyllum nodosum. J. Soc. Chem. Ind., 67,* 355-357.

1949.- The seasonal variation in chemical composition of some of the littoral seaweeds common to Scotland. Part II. *Fucus serratus, F. vesiculosus, F. spiralis* and *Pelvetia canaliculata. J. Soc. Chem. Ind., 68,* 183-189.

1950.- The effect of the depth of immersion of the chemical constitution of some of the sublittoral seaweeds common in Scotland. *J. Soc. Chem. Ind., 69,* 161-165.

1953.- Constituents of marine Algae. *Ann. Report Chem. Soc., 50,* 322-355.

1954.- Concentration gradients and their significance in *Laminaria saccharina. J. Mar. Biol. Ass., 33,* 49-60.

BLACK, W.A.P. et **DEWAR, E.P., 1949.**- Correlation of some of the physical and chemical properties of the sea with the chemical composition of the Algae. *J. Mar. Biol. ASS., 38,* 673-699.

BLANK, G.E. et **SONDHEIMER, E., 1969.**- The influence of polyphenols on potato phosphorylase. *Phytochem., 8,* 823-826.

BLINKS, L.R. et **AIRTH, R.L., 1957.**- Physicochemical properties of the phycobilins from *Porphyra naiadum. J. Gen. Physiol., 41,* 77-90.

BOALCH, G.T., 1961.- Studies on *Ectocarpus* in culture. I. Introduction and methods of obtaining uni-algal and bacteria-free cultures. *J. Mar. Biol. Ass. U.K., 41,* 279-286.

BOLINDER, A.E. et **LARSEN, B., 1961.**- Studies on the microbiological determination of niacin in some marine Algae. *Acta Chem. Scand., 15,* 823-838.

BONE, D.H., 1959.- Metabolism of citrulline and ornithine in mung bean mitochondria. *Plant Physiol., 34,* 171-175.

BOWES, G.W., 1969.- Carbonic anhydrase in marine Algae. *Plant Physiol., 44,* 726-732.

BREMER, H.J. et **SCHWEIGER, H.G., 1960.**- Der NH_3 -Gehalt kernhaltiger und kernloser Acetabularien. *Planta, 55,* 13-21.

BRIJ MOHAN MITRUKA, 1966.- Arginine, citrulline and ornithine catabolism by *Clostridium botulinum,* type 62-A. *Dissert. Abstr., 26,* 4215-4216.

BRUNEL, A., 1948.- Traité Pratique de Chimie Végétale. Imprimerie GEORGES Frères. Tourcoing. Nord.

BRUNEL, A. et **BRUNEL-CAPELLE, G., 1965.**- Activité arginasique chez *Arum italicum* Mill., organes reproducteurs. *C.R. Acad. Sci., 261,* 4213-4216.

BRUNEL, A., BRUNEL, G. et **MIQUEL, A., 1967.**- Biosynthèse induite de la L-arginine-uréohydrolase (arginase), de la gamma-guanidinobutyrique-uréohydrolase et de la guanidinoacétique-uréohydrolase (glycocyamidase), chez *Penicillium roqueforti. C.R. Acad. Sci., 264,* 2777-2780.

BRUNEL-CAPELLE, G. et **BAILLY-FENECH, G., 1967.**- L'arginase de *Vicia faba* L. Répartition et biosynthèse. *C.R. Acad. Sci., 265,* 792-795.

BRUNEL-CAPELLE, G. et **BARTHE, J.P., 1967.**- L'arginase. Sa répartition chez les plantes à bulbe, à rhizome et à tubercule. *C.R. Acad. Sci., 264,* 314-317.

BRUNEL-CAPELLE, G. et **BRUNEL, A., 1965.**- Activité arginasique chez *Arum italicum* Mill.. Organes végétatifs. *C.R. Acad. Sci., 261,* 2720-2723.

BRUNEL-CAPELLE, G., BRUNEL, A. et **MIQUEL, A., 1967.**- Biosynthèse induite de la L-arginine-uréohydrolase (arginase) chez *Penicillium roqueforti* en fonction de la croissance. Influence de l'ion Mn^{++}. *C.R. Acad. Sci., 265,* 1297-1300.

BRUNEL-CAPELLE, G. et **DE SERRES, M., 1967.**- L'arginase. Sa répartition chez les plantes à bulbe : étude de quelques espèces cultivées du genre *Allium. C.R. Acad. Sci., 264,* 54-57.

BRUNEL-CAPELLE, G., DE SERRES, M. et **BARTHE, J.P., 1967.**- Evolution de l'activité arginasique chez *Vicia faba* L.. Localisation de l'enzyme au cours du développement. *C.R. Acad. Sci., 264,* 454-457.

BURACZEWSKI, S., KLECZKOWSKI, K. et **REIFER, I., 1960.**- Argininosuccinase in the green Pea, Rey Grass and Wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci., 8,* 93-95.

BURNETT, G.H. et **COHEN, P.P., 1957.**- Study of carbamylphosphate-ornithine transcarbamylase. *J. Biol. Chem., 229,* 334-337.

BUTLER, M.R., 1931.- Comparison of the chemical composition of some marine Algae. *Plant Physiol., 6,* 295-305.

1936.- Seasonal variations in *Chondrus crispus. Biochem. J., 30,* 1338-1344.

CHAMPIGNY, M.L., 1960.- Influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger. *Thèse Doct. Sci. Nat.* Librairie Générale de l'Enseignement. Paris.

1963.- Mécanisme de synthèse des acides aminés dans les feuilles. Etudes à l'aide du radiocarbone. *Ann. Nut. Alim., 17,* 313-324.

CHANNING, D.M. et **YOUNG, E.G., 1952.**- Peptides and proteins of brown seaweeds. *Chem. and Ind.,* 519.

1953.- Aminoacids and peptides. Part X. The nitrogenous constituents of some marine Algae. *J. Chem. Soc., 503,* 2481-2491.

CHAUDURI, T.K. et **SPENCER, R.P., 1968.**- Aminoacid uptake in *Acetabularia. Protoplasma, 66,* 255-259.

CHEEMA, P.S., PADMANABAN, G. et **SARMA, P.S., 1969.**- Arginase from *Lathyrus sativus. Phytochem., 8,* 409-411.

CHI, M.H., 1963.- Chemical composition of the chinese economic brown seaweeds. *Hai Yang Yu Hu Chao, 5,* 1-10.

CITHAREL, J., 1966.- Recherches sur les constituants azotés des Algues marines. Les acides aminés libres. *C.R. Acad. Sci., 262,* 1495-1497.

1967.- Recherches sur le métabolisme de la citrulline chez les Algues marines. *C.R. Acad. Sci., 265,* 1616-1618.

CITHAREL, J. et **VILLERET, S., 1964.**- Recherches sur le métabolisme azoté de quelques Algues marines des côtes bretonnes. In : C.R. IV Cong. Intern. Algues marines. Biarritz, 1961. DAVY de VIRVILLE A. et FELDMANN J. edts. Pergamon Press. Oxford. Londres. New York. Paris. p. 292-300.

1964.- Recherches sur les constituants azotés des Algues marines. I. Evolution de l'azote total et de l'azote soluble chez *Furcellaria fastigiata* (L.) Lam. et *Bifurcaria rotunda* (Huds.) Papenfuss. *Bull. Lab. mar. Dinard, 49-50,* 99-109.

1965.- Recherches sur les constituants azotés des Algues marines. II. Les principaux acides aminés de *Fucus spiralis* L.

et leur variation au cours de la croissance de l'algue. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét., 11,* 343-350.

CLEMENT, G., GIDDEY, C. et **BAILLEY, B.M., 1963.**- Aminoacid composition and nutritive of the Alga *Spirulina maxima. J. Sci. Food Agric., 18,* 497-501.

COLEMAN, R.G., 1957.- The effect of sulfur deficiency on the free amino-acids of some plants. *Austr. J. Biol. Sci., 10,* 50-56.

1958.- Occurrence of ornithine in sulfur deficient flax and possible place of ornithine and citrulline in the arginine metabolism of some higher plants. *Nature, 181,* 776.

COLEMAN, R.G. et **HEGARTY, M.P., 1957.**- Metabolism of D.L.ornithine-2-^{14}C in normal and potassium deficient barley. *Nature, 179,* 376-377.

CORRELL, D.L. et **TOLBERT, N.E., 1962.**- Ribonucleic acid-polyphosphate from Algae. I. Isolation and physiology. *Plant Physiol., 37,* 627-636.

COULSON, C.B., 1953.- Amino acids of marine Algae. *Chem. Ind.,* 971-972.

1953.- Proteins of marine Algae. *Chem. Ind.,* 977-978.

1955.- Proteins and amino acids of marine Algae. *J. Sci. Food Agric., 6,* 674-682.

CRANE, F.A., 1951.- Thèse. Rochester. Cité par MOREL G. et DURANTON H.,

1958 : Métabolisme de l'arginine par les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol., 60,* 2155-2167.

CRANE, F.A. et **STEWARD, F.C., 1962.**- Studies of *Mentha piperita* L. Effects of accute deficiency of specified nutrients on *Mentha piperita* L.. *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem., 379,* 91-129.

DAIGO, K., 1959.- Studies on the constituents of *Chondria armata.* III. Constitution of domoic acid. *J. Pharm. Soc. Japan, 79,* 356-360.

DAVIS, R.H., 1963.- *Neurospora* mutant lacking an arginine specific carbamyl phosphokinase. *Science, 142,* 1652-1654.

1965.- Carbamylphosphate synthesis in *Neurospora crassa.* II. Genetic position, metabolic and regulation of arginine specific carbamyl-phosphokinase. *Biochim. Biophys. Acta, 107,* 54-68.

1965.- Carbamylphosphate synthesis in *Neurospora crassa.* I. Preliminary characterization of arginine specific carbamylphosphokinase. *Biochim. Biophys. Acta, 107,* 44-53.

DAVIS, R.H. et **THWAITES, W.M., 1963.**- Structural gene for ornithine transcarbamylase in *Neurospora. Genetics, 48,* 1551-1558.

DAVISON, D.C. et **ELLIOTT, W.H., 1952.**- Enzymic reaction between arginine and fumarate in plant and animal tissues. *Nature, 169,* 313-314.

DE DEKEN, R.H., 1962.- Pathway of arginine biosynthesis in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 8,* 462-466.

DEKKER, C.A., STONE, D. et **FRUTON, J.S., 1949.**- A peptide from a marine Alga. *J. Biol. Chem., 181,* 719.

DE SERRES, M. et **BRUNEL-CAPELLE, G., 1966.**- L'arginase : sa présence chez la Jacinthe, l'Innocence et les variations de son activité de la mise en végétation à la fructification. *C.R. Acad. Sci., 262,* 1098-1101.

DOKHAN, R., 1953.- Présence of free and combined arginine in marine Algae. *C.R. Soc. Biol., 147,* 1566-1568.

DOUGALL, D.K. et **FULTON, M.M., 1967.**- Biosynthesis of protein aminoacids in plant tissue culture. III. Studies on the biosynthesis of arginine. *Plant Physiol., 42,* 387-390.

DROOP, M.R., 1959.- Water-soluble factors in the nutrition of *Oxyrrhis marina. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 38,* 605-620.

1961.- Some chemical considerations in the design of synthetic culture media for marine Algae. *Bot. mar., 2,* 231-246.

DUNCAN, W.A.M., MANNERS, D.I. et **ROSS, A.G., 1956.**- Enzyme systems in marine Algae. Carbohydrase. *Biochem. J., 63,* 44.

DUNDAS, I.E. et **HALVORSON, H.O., 1966.**- Arginine metabolism in *Halobacterium salinum,* an obligately halophytic Bacterium. *J. Bacteriol., 91,* 113-119.

DURAND, G., GUITTON, Y. et **BRUNEL, A., 1965.**- Le métabolisme de l'azote chez les microorganismes et les végétaux supérieurs. II. Les uréides. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét., 11,* 15-34.

DURANTON, H., 1958.- Evolution de l'arginine dans le topinambour au cours du cycle végétatif. *C.R. Acad. Sci., 246,* 2655-2657.

1958.- Sort des atomes de la molécule d'arginine au cours de sa dégradation par les tissus du topinambour. *C.R. Acad. Sci., 246,* 3095-3098.

1958.- Sort des atomes du groupement amidine de la molécule d'arginine, au cours de sa dégradation par les tissus du topinambour. *C.R. Acad. Sci., 247,* 502-504.

1959.- Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du topinambour cultivés in vitro. *Thèse Doct. Sc. Nat.. Inst. Nation. Rech. Agro..* Paris.

DURANTON, H., DURST, F. et **KIENTZ, G., 1963.**- Action de la lumière sur le métabolisme de l'arginine dans les tissus du topinambour cultivés *in vitro. Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét., 9,* 99-105.

DURANTON, H. et **MAILLE, M., 1962.**- Métabolisme de la proline chez le topinambour. *Ann. Physiol. Végét., 4,* 271-294.

DURANTON, H. et **WURTZ, R., 1965.**- Conversion de l'ornithine en proline dans les tissus du topinambour. *Physiol. Végét., 3,* 7-22.

ELODI, P., 1954.- Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Harnstoff und Zitrullin. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 6,* 225-233.

ERICSON, L.E. et **CARLSON, B., 1953.**- Studies on the occurence of aminoacids, niacin and pantothenic acid in marine Algae. *Ark. Kemi, 6,* 511-522.

ERICSON, L.E. et **LEWIS, L., 1953.**- On the occurence of vitamin B12-factors in marine Algae. *Ark. Kemi, 6,* 427-442.

ERICSON, L.E. et **SJOSTROM, AG.M., 1952.**- Aminoacids in marine Algae. *Acta Chem. Scand., 6,* 805.

FELDMANN, J., 1954.- Inventaire de la flore marine de Roscoff. Algues. Champignons. Lichens et Spermaphytes. *Suppl. 6 aux "Travaux de la station biologique de Roscoff".*

1960.- Sur quelques problèmes biochimiques posés par l'étude cytologique des Algues rouges. In : "Chimie et Physicochimie des principes immédiats tirés des Algues". Coll. Intern. du C.N.R.S. Dinard. 17-27.

FOGG, G.E., 1953.- The metabolism of Algae. Methuen and Co. Ltd. London.

1962.- Nitrogen fixation. In : Physiology and Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 161-170.

FOTYMA, M.W., KLECZKOWSKI, K. et **REIFER, I., 1961.**- Synthesis of arginine in plant homogenates. *Bull. Acad. Polon. Sci., 9,* 61-64.

FOWDEN, L., 1951.- Aminoacids of certain Algae. *Nature, 167,* 1030-1031.

1952.- The effect of age of the bulk protein composition of *Chlorella vulgaris. Biochem. J., 52,* 310-313.

1954.- A comparison of the compositions of some Algae proteins. *Ann. Bot., 18,* 257-266.

1962.- Aminoacids and proteins. In : Physiology and Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 189-209.

1967.- Aspects of aminoacid metabolism in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol., 18,* 85-106.

FRENCH, C.S. et **YOUNG, U.K., 1952.**- The fluorecence spectra of red Algae and the transfert of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. *J. Gen. Physiol., 35,* 873-890.

FREUDENTHAL, P., 1956.- The vitamin content of Algae and its scientific consequences. In : Second Intern. Seaweeds Symp.. Pergamon Press. London. New York. Paris. p. 62.

FUJIWARA, J., 1955.- Chromoproteins in Japanese Nori (*Porphyra tenera*). *J. Biochem. (Japan), 42,* 411-417.

1956.- Id. *J. Biochem. (Japan), 43,* 195-203.

1958.- Id. *J. Biochem. (Japan), 44,* 723-733.

GOAS, G., 1965.- Evolution de l'arginine libre et de l'activité arginasique dans les plantules privées de leurs cotylédons et dans les racines isolées de *Pisum sativum* L. *C.R. Acad. Sci., 261,* 4217-4219.

GOAS, G. et **LE BOURHIS, M.Y., 1965.**- Etude l'activité uréasique de plantules de Pois privées de leurs cotylédons, cultivées en présence d'urée. *C.R. Acad. Sci., 260,* 4061-4063.

GREENBERG, D.M., 1955.- Arginase. In : Methods in Enzymology. Vol. II. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. edts. Academic Press. New York. p. 368.

GRISOLIA, S., 1955.- Enzymatic synthesis of citrulline. In : Methods in Enzymology. Vol. II. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. edts. Academic Press. New York. p. 350.

GUITTON, Y., 1964.- Métabolisme de l'arginine dans les premiers stades du développement de *Pinus pinea* L.. *Thèse Doct. Sci. Nat.*. Toulouse.

GUITTON, Y., DURAND, G. et **BRUNEL, A., 1965.**- Sur le métabolisme de l'azote chez les microorganismes et les végétaux supérieurs. I. L'urée. *Bull. Soc. Physiol. Végét., 11,* 3-15.

HAAS, P., 1950.- On certain peptides occurring in marine Algae. *Biochem. J., 46,* 503-505.

1958.- Protein metabolism of Algae. In : Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 8. RUHLAND W. edt. Springer Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg. p. 648-658.

HAAS, P. et **HILL, T.G., 1931.**- A preliminary note on the nitrogen metabolism of seaweeds. Glutamic acid peptides. *Biochem. J., 25,* 1472-1475.

1933.- The metabolism of calcareous Algae. *Biochem. J., 27,* 1801-1804.

1933.- Observations on the metabolism of certain seaweeds seaweeds. *Ann. Bot., 47,* 55-57.

HAAS, P., HILL, T.G. et **KARSTENS, W.K.H., 1935.**- The metabolism of calcareous Algae. II. The seasonal variation in certain metabolic products of *Corallina squamata. Ann. Bot., 49,* 609-619.

HAAS, P., HILL, T.G. et **RUSSELL-WELLS, B., 1938.**- On certain peptides occuring in marine Algae. *Biochem. J., 32,* 2129-2133.

HANNIG, K., 1959.- "Expériences concernant le dosage quantitatif des acides aminés à l'aide de colonnes d'échangeurs d'ions et l'enregistrement automatique des résultats".. *Clin. Chim. Acta, 4,* 51.

HATTORI, A., 1957.- Studies on the métabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea.* I. Assimilation of urea and other

nitrogenous compounds by nitrogen starved cells. *J. Biochem., 44,* 253-273.

1958.- Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea.* II. Changes on levels of aminoacids and amides during assimilation of NH_3 and urea by nitrogen starved cells. *J. Biochem., 45,* 57-64.

1960.- Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea.* III. Assimilation of urea. *Plant and cell Physiol., 1,* 107-116.

HATTORI, A. et **UESUGI, I., 1968.**- Purification and properties of nitrite reductase from the blue-green Alga *Anabaena cylindrica. Plant Cell Physiol., 9,* 689-699.

HAUG, A, et **JENSEN, A., 1954.**- Seasonal variations in the chemical composition of *Alaria esculenta, Laminaria saccharina, L. hyperborea* and *L. digitata* from northern Norway. *Norvegian Institute of Seaweed Resarch. Report nº 4.*

1956.- Seasonal variation in chemical composition of *Laminaria digitata* from different parts of the norvegian coast. In : Second Intern. Seaweeds Symp.. Pergamon Press. London. New York. Paris. p. 10-15.

HAVIR, E.A., HADASSAH, T., RATNER, S. et **WARNER, R.C., 1965.**- Biosynthesis of urea. XI. Preparation and properties of cristalline argininosuccinase. *J. Biol. Chem., 240,* 3079-3088.

HAXO, F.T. et **BLINKS, L.R., 1950.**- Photosynthetic action spectra in marine Algae. *J. Gen. Physiol., 33,* 389-422.

HAXO, F.T., O'HEOCHA, C. et **NORIS, P., 1955.**- Compared studies of chromatography separated phycoerythrins and phycocyanins. *Arch. Biochem. Biophys., 54,* 162-173.

HENDERLONG, P.R. et **SMITH, R.R., 1966.**- Determination of free ammonium, asparagine and glutamine amide-nitrogen in extracts of plants tissues. *Plant Physiol., 41,* 1102-1105.

HILLER, R.G., 1964.- Synthesis of citrulline and arginine in *Chlorella pyrenoidosa. J. Exper. Bot., 15,* 15-20.

HODSON, R.C. et **THOMPSON**, J.F., **1966.**- Urea metabolism in *Chlorella*. *Plant Physiol., Proc. Ann. Meetings,* p, 11,

1969.- Metabolism of urea by *Chlorella vulgaris. Plant Physiol., 44,* 691-696.

HOLLEY, R.W. et **CAIN**, J.C., **1955.**- Accumulation of arginine in plants afflicted with iron deficiency type chlorosis. *Science, 121,* 172-173.

HOLM-HANSEN, O. et **BROWN**, G.W., **1963.**- Ornithine cycle enzymes in the blue-green Algae *Nostoc muscorum. Plant Cell Physiol., 4,* 299-306.

HOLM-HANSEN, O. et **LEWIN**, R.A., **1965.**- Bound ornithine in certain Flexibacteria and Algae. *Physiol. Plant., 18,* 418-423.

HONG, S.W., **1964.**- The distribution of aminoacids in marine Algae. Abst. 10 Int. Bot. Congress. p. 386.

HUDOCK, G.A., **1962.**- The pathway of arginine biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii. Biochim. Biophys. Acta, Res. Comm., 9,* 551-555.

HUMPHRIES, E.C., **1956.**- Mineral components and ash analysis. In : Modern methods of plant analysis. PAECH K. et TRACEY M.V. edts. Springer Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg. Vol. 1, p. 481-482.

HUTNER, S.H. et **PROVASOLI**, L., **1964.**- Nutrition of Algae. *Ann. Rev. Plant Physiol., 15,* 37-56.

HUVE, H. et **PELLEGRINI**, M., **1969.**- Contribution à l'étude chimique de quelques espèces du genre *Laurencia* (Ceramiales.Rhodomélacées). In : VIe Intern. Seaweeds Simposium, Santagio de Compostela, 1968.Edt Madrid, 1969. p. 483-492.

IKEMORI, M. et **NISHIDA**, K., **1968.**- Carbonic anhydrase in the marine Alga *Ulva pertusa. Physiol. Plant., 21,* 292-297.

ITO, K., **1963.**- Distribution of D-cysteinolic acid in Marine Algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 29,* 771-775.

1965.- Occurence of D-glyceryltaurine and amino-pattern of the extractives of a red Alga, *Gymnogongrus flabelliformis. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 31,* 307-311.

1969.- Free aminoacids and peptides in marine Algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 32,* 116-129.

ITO, K. et **HASHIMOTO, Y., 1966.**- Isolation of a new aminoacid : Gigartinine, from a red Alga, *Gymnogongrus flabelliformis. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 32,* 274-279.

ITO, K., MIYAZAWA, K. et **HASHIMOTO, Y., 1966.**- Distribution of Gongrine and Gigartinine in marine Algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 32,* 727-729.

1967.- Occurence of gamma-guanidinobutyric acid and concentration of Gongrine and Gigartinine in *Gymnogongrus flabelliformis. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 33,* 572-577.

ITO, K., SATO, S., SATO, Y. et **MATSUMOTO, F., 1960.**- Biochemical study of the alga *Porphyra tenera.* II. Utilisation of some nitrogenous compounds *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 26,* 938-943.

IWAMURA, T., 1962.- Nucleotides and nucleic acids. In : Physiology an Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 231-238.

JACOBI, G., 1954.- Die Verteilung des Stickstoffs in *Fucus vesiculosus* und *Laminaria saccharina* deren Abhängigkeit vom Jahresrhythmus. *Kieler Meeresf., 10,* 37-57.

1956.- Vergleichende Untersuchungen über den Stickstoffumsatz bei der Rezeptakelbildung bei *Fucus vesiculosus. Kieler Meeresf., 12,* 65-71.

1957.- Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels in *Ulva lactuca.* Transaminasen und Aminosäure dehydrogenasen. *Planta, 49,* 561-577.

1958.- Uber die Bestimmung stationärer Konzentrationen von Brenztraubensäure und alpha-cetoglutarsäure in Laminarien. *Kieler Meeresf., 14,* 247-250.

1959.- Salinitätswirkung des Seewasser auf die Enzymaktivität von *Ulva Lactuca. Kieler Meeresf., 15,* 161-163.

1962.- Enzyme systems. In : Physiology and Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 125-140.

JONES, M.E., SPECTOR, L. et **LIPMANN, F., 1955.**- Carbamylphosphate, the carbamyldonor in enzymatic citrulline synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.,77,* 819-820.

JONES, R.F., 1956.- On the chemical composition of the brown alga *Himanthalia elongata. Biol. Bull., 110,* 169-178.

1957.- Variations of nitrogen and carbohydrate constituents during the development of *Himanthalia elongata. Biol. Bull., 112,* 81-91.

1958.- Aminoacids and peptides in marine Algae. *Rev. Algol., 4,* 91-93.

JONES, R.F. et **BLINKS, L.R., 1957.**- The aminoacid constituents of the phycobilins chromoproteins of the red alga *Porphyra. Biol. Bull., 112,* 363-370.

KAPELLER-ADLER, R. et **CSATO, T., 1930.**- the occurence of methylated nitrogen compounds in brown Algae. *Biochem. Z., 224,* 378-383.

KAPELLER-ADLER, R. et **VERING, F., 1931.**- The occurence of methylated nitrogen compounds in brown Algae and in some cold-blooted animals, with special reference to trimethylamine. *Biochem. Z., 243,* 292-309.

KARLSTROM, O., 1963.- The vitamin B_{12} content of marine Algae. *Norvegian Inst. of Seaweeds Res.. Report n^{o} 29.*

KASHIWABARA, Y., SUZUKI, H. et **NUSIZAWA, K., 1965.**- Some enzymes relating to the metabolism of starch in sea-lettuce. *Plant Cell Physiol., 6,* 537-546.

KASTING, R. et **DELWICHE, C.C., 1957.**- The presence of ornithine cycle aminoacids in some higher plants. *Plant Physiol., 32,* 471-475.

1958.- Ornithine, arginine and citrulline metabolism in watermelon seedlings. *Plant Physiol., 33,* 350-354.

KATING, H., 1962.- Untersuchungen über den Ornithinzyklus bei niederen und höheren Pflanzen. *Berl. dtsch. bot. Gesellsch., 75,* 36-37.

1963.- Harnstoff-synthese über den Ornithin-zyklus in jungen Gerstenwurzeln. *Biochem. Z., 336,* 489-494.

KLECZKOWSKI, K., 1965.- L-glutamine as donor of carbamoylgroup nitrogen for the enzymic synthesis of citrulline in green pea seedlings. *Acta Biochim. Polon., 12,* 343-349.

KLECZKOWSKI, K. et **COHEN, P.P., 1964.**- Purification of ornithine transcarbamylase from pea seedlings. *Arch. Biochim. Biophys., 107,* 271-278.

KLECZKOWSKI, K. et **KRETOVITCH, W.L., 1964.**- The transamination of the ornithine-cycle aminoacids in pea and wheat seedlings. *Biochem. (S.S.S.R.) 25,* 164-167.

KNIVETT, V.A., 1954.- The effect of arsenate on bacterial citrulline breakdown. *Biochem. J., 56,* 606-610.

1954.- The anaerobic interconversion of ornithine and citrulline by *Steptococcus faecalis. Biochem. J., 58,* 480-486.

1954.- Phosphorylation coupled with anaerobic breakdown of citrulline. *Biochem. J., 56,* 602-606.

KORZENOVSKY, M., 1955.- Metabolism of arginine and citrulline by bacteria. In : A symposium of aminoacid metabolism. Mc ELROY W.D. et GLASS B. edts. The Johns Hopkins Press. Baltimore. p. 309.

KREBS, H.A., 1952.- Urea synthesis. In : The Enzymes. Chemistry and Mechanism of action. SUMNER J.B. et MYRBACH K. edts. Academic Press. New York. Vol. II, part 2, p. 866-885.

KREBS, H.A. et **HENSELEIT, K., 1932.**- Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem., 210,* 33-36.

KURIYAMA, M., 1961.- Ninhydrine reactive substances in marine Algae. I. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 27,* 689-694.

1961.- Ninhydrine reactive substances in marine Algae. II. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 27,* 694-698.

KURIYAMA, M., TAKAGI, M. et **MURATA, K., 1961.**- Chemical studies on marine Algae. On a new aminoacid, "chrondrine", isolated from the red alga *Chondria crassicaulis. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 11,* 58-66.

LANDSBERGER, W., SCHWENCKE, J. et **ABARCA, F., 1969.**- Determinacion cromatografica de aminoacidos libres en Algas pardas Chilenas. *Bot. mar., 12,* 218-227.

LARHER, F., 1968.- Contribution à l'étude du métabolisme azoté des halophytes. Quelques aspects du métabolisme de l'arginine chez *Limonium vulgare* Mill.. *Thèse Doct. de Spécial. Physiol. Végét.,* Rennes.

LARHER, F. et **GOAS, M., 1967.**- Contribution à l'étude du métabolisme azoté de *Limonium vulgare* Mill.. Détermination des conditions optimales d'action de l'arginase. *C.R. Acad. Sci., 265,* 1179-1182.

LARSEN, B., 1961.- The biotin content of marine Algae. *Norvegian Inst. of Seaweeds Res. Report n^{o} 26.*

LARSEN, B. et **HAUG, A., 1961.**- The distribution of iodine and other constituents in the stipe of *Laminaria hyperborea. Bot. mar., 2,* 250-254.

LARSEN, B. et **JENSEN, A., 1957.**- The determination of nitrate and nitrite in algal materiel, and the seasonal variation in the nitrate content of some norvegian seaweeds. *Norv. Inst. Seaweeds Res., Report n^{o} 15.*

LEAF, G., GARDINER, I.C. et **BOND, C., 1958.**- Observations on the composition and metabolism of the nitrogen-fixing root-nodules of *Alnus. J. Exp. Bot., 9,* 320-330.

LEON, A.I. de, EUFEMIO, N. et **PINEDA, M., 1963.**- Chemical composition of some philippine Algae. *J. Philip. Pharm. Ass., 49,* 287-297.

1963.- Chemical composition of some philippine Algae. *Philip. J. Sci., 92,* 77-87.

LEVENBERG, B., 1962.- Role of L-glutamine as donor of carbamyl-nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in *Agaricus bisporus. J. Biol., Chem., 237,* 2590-2598.

LEVRING, T., HOPPE, H.A. et **SCHMID, O.J., 1969.**- Marine Algae. Cram, De Gruyter et C^{ie}. Berlin.

LEWIN, R.A., 1962.- Physiology and Biochemistry of Algae. Academic Press. New York. London.

LEWIS, E.J., 1962.- Studies on the proteins, peptides and free aminoacids contents in some species of brown Algae from the southaestern coast of India. *Rev. algol., 6,* 209-216.

1962.- Studies on the protein, peptide and free aminoacid composition in some species of *Padina. Curr. Sci., 31,* 90-92.

1963.- Studies on the protein, peptide and free aminoacid contents in some species of brown Algae. *Rev. algol., 7,* 15-25.

1963.- The proteins, peptides and free aminoacids in some species of red Algae from southeastern coast of India. *Poc. Nat. Inst. Sci. India, 29,* 137-145.

1963.- Fortnightly analysis of the proteins, peptides and free aminoacids in some marine Algae from Bombay. *Proc. Nat. Inst. Sci. India, 29,* 263-286.

1964.- The protein, peptide and free aminoacid composition in species of *Acanthophora. Rev. Algol., 7,* 236-241.

1965.- The free and combined aminoacid content in species of *Caulerpa* from the southeast coast of India. *Fish. Technol., 2,* 187-192.

LEWIS, E.J. et **GONZALVES, E.A., 1959.**- Studies on the free aminoacid contents of some marine Algae from Bombay. *J. Univ. Bombay, 28,* 1-5.

1959.- Aminoacid contents of the erect and creeping fronds of species of *Caulerpa* from Bombay. *J. Mar. Biol. Ass. India, 1,* 54-56.

1959.- Studies on the free aminoacid contents of species of *Caulerpa* from Bombay. *J. Mar. Biol. Ass. India, 1,* 203-205.

1960.- Aminoacid contents of some marine Algae from Bombay. *New Phytol., 59,* 109-115.

1962.- Periodic studies of the proteins, peptides and free aminoacids in *Enteromorpha prolifera f. capillaris* and *Ulva lactuca* var. *rigida. Ann. Bot., 26,* 317-327.

1962.- The protein, peptide and free aminoacid contents of some species of marine Algae from Bombay. *Ann. Bot., 26,* 301-316.

1962.- Studies on the proteins, peptides and free aminoacids in cystocarpic and tetrasporic plants of *Agardhiella robusta* from Bombay. *New Phytol., 61,* 288-290.

LINDBERG, B., 1955.- Methylated taurine and choline sulfate in red Algae. *Acta Chem. Scand., 9,* 1323-1326.

LINKO, P., HOLM-HANSEN, O., BASSHAM, J.A. et **CALVIN, M. 1957.**- Formation of radioactive citrulline during photosyntetic $^{14}CO_2$ fixation by blue-green Algae. *J. Exp. Bot., 8,* 147-156.

LINSKENS, H., 1963.- Beitrag zur Frage des Beziehungen zwischen Epiphyt und Basiphyt bei marinen Algen. *Publ. Staz. Zool. Napoli, 33,* 274-293.

LOOMIS, W.D., 1958.- Aminoacid synthesis in plants. In : Handburch der Pflanzenphysiologie. RUHLAND W. edt. Springer Verlag. Berlin Göttingen. Heidelberg. Vol. 8. p. 224-248.

LOOMIS, W.D. et **BATAILLE, J., 1966.**- Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem., 5,* 423-438.

LOOMIS, W.D. et **STUMPF, P.K., 1958.**- Transamination and transamidation. In : Handburch der Pflanzenphysiologie. RUHLAND W. edt. Springer Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg. Vol. 8, p. 248-261.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et **RANDALL, R.J., 1951.**- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem., 193,* 265-275.

LUGG, J.W.H., 1949.- Plant proteins. In : Advances in Proteins Chemistry. ANSON M.L., BAILEY K. et EDSALL J. edts, Academic Press. New York. Vol. 5, p. 229-304.

LUNDE, G. et **LIE, J., 1938.**- Vitamin C in Meeres Algen. *Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem., 254,* 227-240.

LUNDIN, H. et **ERICSON, L.E., 1956.**- On the occurrence of vitamins in marine Algae. In : Second Intern. Seaweeds Symp.. Pergamon Press. London. New York. Paris. p. 39-43.

LYNN, K.R., 1967.- Some properties and purification of urease. *Biochim. Biophys. Acta, 146,* 205-218.

MACPHERSON, M.G. et **YOUNG, E.G., 1949.**- The chemical composition of marine Algae. *Canad. J. Res., 27,* 73-77.

1952.- Seasonal variation in the chemical composition of the Fucacea in the maritime provinces. *Canad. J. Bot., 30,* 67-77.

MAKISUMI, S., 1959.- Occurrence of arginylglutamine in a green alga, *Cladophora species. J. Biochem., 46,* 63-71.

MANDELLI, M.O., 1964.- Sobre a composicao quimica de algunas especies de algas marinas brasileiras. *Cienc. Cult., 16,* 281-284.

MARTIN-PREVEL, P., 1967.- Nature et signification de divers modes d'échantillonnage en agro-physiologie. *Biom. Praxim., 8,* 69-83.

MAZELIS, M., 1969.- Conversion of ornithine into proline by enzymes from germinating peanut cotyledons. *Phytochem., 8,* 801-809.

MAZUR, A. et **CLARK, H.T., 1938.**- The aminoacids in certains marine Algae. *J. Biol. Chem., 123,* 1729-1740.

Mc LACHLAN, T. et **CRAIGIE, J.S., 1964.**- Algal inhibition by yellow ultraviolet absorbing substances from *Fucus vesiculosus. Canad. J. Bot., 42,* 287-292.

MEISTER, A.J., 1954.- Enzymatic transamination reaction involving arginine and ornithine. *J. Biol. Chem., 206,* 587-596.

MEDVEDEVA, E.F. et **SELICH, E.F., 1968.**- "Alkali-soluble proteins from Black Sea red alga *Phyllophora nervosa".* (en Russe). *Biokhim., 33,* 635-643.

MEDVEDYEVA, E.I. et **ARESHYDZE, I.V., 1968.**- "Composition en acides aminés de *Phyllophora nervosa* (D.C.) Grev.. (en Russe). *Ukr. Bot. Zh., 25,* 86-90.

MENAGE, A. et **MOREL, G., 1962.**- Métabolisme de l'arginine par les tissus de tumeur végétale cultivés *in vitro. C.R. Acad. Sci., 255,* 2641-2643.

1964.- Métabolisme de l'arginine dans les tissus de tumeurs de crown-gall cultivés *in vitro. Physiol. Végétale, 2,* 1-8.

1965.- Sur la présence d'un acide aminé nouveau dans les tissus du crown-gall. *C.R. Soc. Biol., 159,* 561-562.

METZENBERG, R.L., MARSHALL, M. et **COHEN, P.P., 1957.**- Studies on the Biosynthesis of carbamylphosphate. *J. Biol. Chem., 229,* 1019-1025.

1958.- Carbamylphosphate synthetase : studies on the mechanism of action. *J. Biol. Chem.., 233,* 1560-1564.

MIDDLEHOVEN, W.J., 1963.- The ornithine pathway in the yeast *Candida utilis. Biochim. Biophys. Acta, 77,* 152-154.

MIETTINEN, J.K. et **VIRTANEN, A.I., 1952.**- The free aminoacids in the leaves, roots and roots nodules of the alder. *Physiol. Plant., 5,* 540-557.

MOREL, G. et **DURANTON, H., 1958.**- Le métabolisme de l'arginine par les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol., 40,* 2155-2167.

MOSS, B.L., 1948.- Studies in the genus *Fucus*. I. On the structure and chemical composition of *Fucus vesiculosus* from three scottish localities. *Ann. Bot., 12,* 267.

1950.- Studies in the genus *Fucus*. II. The anatomical structure and chemical composition of receptacles of *F. vesiculosus* from three contrasting habitats. *Ann. Bot., 14,* 396-410.

1952.- Variation in chemical composition during the development of *Himanthalia elongata* (L.) S.F. Gray. *J. Mar. Biol. Ass. U.K., 31,* 29-34.

MUNDA, I., 1964.- The influence of salinity one the chemical composition growth and fructification of some Fucaceae. In : C.R.. IV Cong. Intern. Algues Marines. DAVY de VIRVILLE A. et FELDMANN J. edts. Pergamon Press. Oxford. London. New York. Paris. p. 123-126.

1964.- Quantity and chemical composition of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. along the coast between the river Olfusa Thjorsa (Southern Iceland). *Bot. mar., 7,* 76-89.

NAKAMURA, S., ASHINO, K. et **YAMAMOTO, A., 1968.**- Distribution of transaminase in marine Algae. *Bot. mag. Tokyo, 81,* 74-78.

NASATIR, M. et **BROOKS, A.E., 1966.**- DNA of the marine alga *Griffithsia globulifera. J. Phycol., 2,* 144-147.

NASR, A.H., BEKHEET, I.A. et **IBRAHIM, R.K., 1967.**- An electro-chromatographic investigation of the aminoacid pattern of some marine Algae from Alexandria. *Hydrobiol., 29,* 80-92.

1968.- The effect of different nitrogen and carbon sources on aminoacid synthesis in *Ulva, Dictyota* and *Pterocladia. Hydrobiol., 31,* 7-16.

NAYLOR, A.W., 1959.- Interrelations of ornithine, citrulline and arginine in plants. In : Symposia of the Society for experimental Biology. XIII. Utilization of Nitrogen and its compounds by plants. Co. Biol. Soc. Exp. Biol. edt. University Press, Cambridge. p. 193-209.

O'CARRA, P., 1965.- Purification and N-terminal analyses of algal biliproteins. *Biochem. J., 94,* 171-174.

O'CARRA, P. et **O'HEOCHA, C., 1965.**- R-phycocyanin, a distinct type of biliprotein. *Phytochem., 4,* 635-638.

1966.- Bilins and biliproteins released from Algae by methanolic extraction. *Phytochem., 5,* 993-997.

O'CARRA, P., O'HEOCHA, C. et **CARROL, D.M., 1964.**- Spectral properties of the Phycobilins. II. Phycoerythrobilin. *Biochem., 3,* 1343-1350.

OGINO, C., 1955.- Biochemical studies on the nitrogenous compounds of Algae. *J. Tokyo Univ. Fish., 41,* 107-152.

OGINSKY, E.L., 1955.- Arginine dihydrolase. In : Methods in Enzymology. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. edts. Academic Press. New York. T. II. p. 374.

1955.- Mechanisms of arginine and citrulline breakdown in microorganisms. In : A symposium of aminoacid metabolism. Mc ELROY W.D. and Glass B. edts. Baltimore. The Johns Hopkins Press. p. 300.

OGINSKY, E.L. et **GEHRIG, R.F., 1952.**- The arginine dihydrolase system of *Streptococcus faecalis.* II. Properties of arginine desimidase. *J. Biol. Chem., 198,* 799-805.

O'HEOCHA, C., 1960.- Spectrophotometric studies of some red algal constituents. In : Chimie et Physicochimie des principes immediats tirés des Algues. Coll. Intern. CNRS. Dinard. p. 121-134.

1965.- Biliproteins of Algae. *Ann. rev. Plant Physiol., 16,* 415-434.

1962.- Phycobilins. In : Physiology and Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 421-435.

OHIRA, T., 1939.- On a new polypeptide isolated from *Eisenia bicyclis.* I. Isolation of eisenine and its hydrolytic products. *J. Agric. Chem. Soc. Jap., 15,* 370-376.

1940.- A new polypeptide isolated from *Eisenia bicyclis.* II. Chemical structure of eisenine I. *J. Agric. Chem. Soc. Jap., 16,* 1-6.

1940.- A new polypeptide isolated from *Eisenia bicyclis.* III. Chemical structure of eisenine II. *J. Agric. Chem. Soc. Jap., 16,* 293-298.

OKUMURA, A., OISHI, K. et **MURATA, K., 1963.**- Quality of Kombu, one of the edible seaweeds belonging to the Laminariaceae. VIII. Water-extracting conditions of total- and amino- nitrogen. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 29,* 1089-1091.

OLSZEWSKA, M.J. et **BRACHET, J., 1960.**- Incorporation de la DL-méthionine-^{35}S dans l'Algue *Acetabularia mediterranea. Arch. Intern. Physiol. Biochem. Belg., 68,* 693-694.

1961.- Incorporation de la DL-méthionine-^{35}S dans les fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia mediterranea. Exp. Cell. Res., 22,* 370-380.

OY, E., 1951.- Proteins in Seaweeds. *Tidsskr. Kjemi Bergv. Metall., 11,* 82-84.

PAKHOMOVA, M.V., 1964.- "Etude biochimique de quelques espèces d'Algues". (en Russe). *Bull. moskov. Obshchest. Ispytalej Prirody, otd biol., 69,* 110-126.

PATIL, B.A. et **JOSHI, G.V., 1970.**- Photosynthetic studies in *Ulva lactuca. Bot. mar., 13,* 111-115.

PEAT, S. et **REES, D.A., 1961.**- Carbohydrase and sulfatase activities of *Porphyra umbilicalis. Biochem. J., 79,* 7-12.

PELLEGRINI, M. 1967.- Contribution à l'étude chimique des Algues méditerranéennes. Composition en acides aminés du *Callithamnion granulatum* (Ducluzeau) C. Agardh. *Ann. Fac. Sci. Marseille, 39,* 163-171.

1968.- Contribution à l'étude chimique des Algues méditerranéennes. Fractions azotées. Acides aminés protidiques. *Thèse Doct. de Spécial.. Sci. Nat.* Marseille.

1969.- Contribution à l'étude chimique des Algues méditerranéennes. Composition en acides aminés de *Falkenbergia rufolanosa* (Harvey) Schmitz et d'*Asparagopsis armata* Harvey. *Bot. mar., 12,* 177-184.

PERCIVAL, E. et **Mc DOWELL, R.H., 1967.**- Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press. London. New York.

PETERSON, D.M. et **TORREY, J.B., 1968.**- Aminoacid incorporation in developping *Fucus* embryons. *Plant Physiol., 43,* 941-947.

PILLAI, V.K., 1957.- Chemical studies on Indian Seaweeds. II. The partition of Nitrogen. *Proc. Ind. Acad. Sci., 45-B,* 43-63.

PUISEUX-DAO, S., 1962.- Recherches biologiques et physiologiques sur quelques Dasycladacées, en particulier le *Batophora Oerstedii* J. Ag. et l'*Acetabularia mediterranea* Lam.. *Thèse Doct. Sci. Nat.*. Paris.

RAFTERY, M.A. et **O'HEOCHA, C., 1965.**- Aminoacid composition and C-terminal residues of algal biliproteins. *Biochem. J., 94,* 166-170.

RAO S. et **TIPNIS, U.K., 1964.**- Protein content of marine algae from Gujarat coast. *Curr. Sci. Bangalore, 33,* 16-17.

RATNER, S., 1954.- Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline. In : Advances in Enzymology. NORD F.F. et WERKMAN C.H. edts. Interscience Publ. Inc. New York. Vol. 15, p. 319-387.

1955.- Enzymatic synthesis of arginine. In : Methods in Enzymology. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. edts. Academic Press. New York. T. II, p. 356.

REIFER, I., KLECZKOVSKI, K., KLIMOWICZ, E. et **ZIELINSKA, K., 1963.**- Ornithine carbamoyltransferase in higher plants. *Acta Biochim. Polonica, 10,* 151-156.

REIFER, I. et **MELVILLE, J., 1949** - The source of ammonia in plant tissue extracts. II. The influence of urea. *J. Biol. Chem., 178,* 715-726.

REUTER, G., 1960.- Der Ornithincyclus und seine Beziehungen zum Stoffwechsel der Stickstoffverbindungen. *Pharmazie, 15,* 618-622.

1961.- Biosynthesis of citrulline in plants.. *Nature, 190,* 147.

ROCHE, J. et **LAFON, M., 1949.**- Sur la présence des iodotyrosines chez les Laminaires. *C.R. Acad. Sci., 229,* 481.

ROSS, A.G., 1953.- Some typical analyses of red seaweeds. *J. Sci. Food Agric., 7,* 333-335.

SATAKE, K. et **LUCK, J.M., 1958.**- The spectrophotometric determination of arginine by the Sakaguchi reaction. .*Bull. Soc. Chim. Biol., 40,* 1743-1756.

SATOH, P.S. et ITO, Y., 1968.- Quantitative micro-assay of arginase. *Anal. Biochem., 23,* 219-229.

SCHIEWER, U., 1965.- Untersuchungen zum Vitamingehalt, Auxingehalt und Auxinstoffwechsel mehrzelliger Ostseealgen. *Dissert.*. Rostock.

1970.- Uber den Vitamingehalt mehrzelliger Ostseealgen. *Bot. mar. 13,* 28-37.

SCHMID, O.J., 1959.- Marine Rotalgen. Chemische Zusammenzetzung. *Bot. mar., 1,* 54-64.

SCHWEIGER, R., 1967.- Low molecular weight compounds in *Macrocystis pyrifera,* a marine alga. *Arch. Biochem. Biophys., 118,* 383-387.

SCOTT, R., 1954.- Observations on the iodo-aminoacids of marine Algae using iodine-131. *Nature, 173,* 1098-1099.

SEHGAL, P.P. et NAYLOR, A.W., 1966.- Ontogenic study of urease in Jack beans, *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.. *Bot. Gaz., 127,* 27-34.

1966.- Purification and properties of urease derived from hydrated seeds of Jack bean *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. *Plant Physiol., 41,* 567-572.

SEHGAL, P.P. et TANIS, R.J., 1965.- A low molecular-weight form of urease. *Biochem. Biophys., Res. comm., 20,* 550-554.

SERENKOV, G.P., 1962.- "Acides nucléiques et évolution chez les Algues". (en Russe). *Izvest. Akad. S.S.S.R., 6,* 857-868.

SERENKOV, G.P. et PAKHOMOVA, M.V., 1960.- "Etude des composés azotés des Algues" (en Russe). *Vest. moskov. Univ., Ser. VI, Biol. Pochvo., 15,* 15-25.

1961.- "La composition chimique de l'algue verte *Dunaliella salina".* (en Russe). *Vest. moskov. Univ., Ser. VI, Biol. Pochvov., 16,* 22-26.

SERENKOV, G.P. et VLADYCHENSKAJA, N.S., 1962.- "Etude des acides nucléiques de certaines espèces d'Algues". (en Russe). *Nauchn. Dokl. vyssh. slk. biol. Nauki, S.S.S.R., 2,* 147-151.

SHAFER, J. et **THOMPSON, J., 1968.**- Arginine desimidase in *Chlorella. Phytochem., 7,* 391-399.

SILVA, F.G., ETCHEVERRY, H.D. et **QUILHOT, W.P., 1965.**- Determinacion cromatografica de aminoacidos en algas marinas. *Bot. mar., 8,* 224-251.

SITAKARA RAO, V. et **TIPNIS, U.K., 1964.**- Protein content of marine Algae from Gujarat coast. *Curr. Sci., India, 33,* 16-17.

SMITH, D.G. et **YOUNG, E.G., 1953.**- On the nitrogenous constituents of *Fucus vesiculosus. J. Biol. Chem., 205,* 849-958.

1955.- The combined aminoacids in several species of marine Algae. *J. Biol. Chem., 217,* 845-853.

SMITH, I., 1954.- Some nitrogenous compounds in Algae. In : Cong. Intern. Bot., Paris, Rapp. Comm., 8ème Section, 17, 34-35.

SNELL, F.D. et **SNELL, C.T., 1949.**- Coloric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Company Inc. New York. Cités par EVANS H.J. et NASON A., 1953. Nitrate Red^{se} from extracts of higher plants. *Plant Physiol., 28,* 233-254.

SORU, E., 1965.- Purification of bacterial arginase. *J. Chromat., 20,* 325-333.

SOSA-BOURDOUIL, A. et **C., 1940.**- Sur les *Fucus* et la composition de leurs fructifications. *Bull. Lab. mar. Dinard, 23,* 43-47.

SOSA-BOURDOUIL, C., 1946.- L'activité enzymatique des anthérozoides et des ovules de *Fucus vesiculosus. Bull. Mus. nation. Hist. Nat., 18,* 142.

SPACKMAN, D.A., STEIN, W.H. et **MOORE, S., 1958.**- Chromatography of aminoacids on sulfonated polystyren resins. *Ann. Chem., 30,* 1185-1190.

SPLITTSTOESSER, W.E., 1969.- Metabolism of arginine by aging and 7 days old Pumpkin seedlings. *Plant Physiol., 44,* 361-366.

SRB, A.M. et **HOROWITZ, N.H., 1944.**- The ornithine cycle in *Neurospora* and its genetic control. *J. Biol. Chem., 154,* 129-139.

STAUB, M. et **DENES, G., 1966.**- Mechanism of arginine biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii.* Purification and properties of ornithine-acetyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta, 128,* 82-91.

STETTEN, M.J., 1951.- Mechanism of the conversion of ornithine into proline and glutamic acid *in vivo. J. Biol. Chem., 189,* 499-587.

STEWARD, F.C., 1963.- The detection of aminoacids, free and combined, in certain marine Algae by use of circular-paper chromatography. A note on the validity of the methods. *Ann. Bot., 27,* 691-692.

STRUSI, A., 1963.- Sulla composizione delle proteine e amminoacide liberi di alcune specie di algue nel Mar Piccolo di Taranto. *Boll. Pesca Piscicolt Idrobiol., 17,* 107-108.

SUGIMURA, K. et **SUH, K.B., 1965.**- Aminoacid contents of food. I. Total and free aminoacids of purple laver (*Porphyra tenera). Eiyôto Shokuryô, 18,* 103-104.

SUSSENBACH, J.S. et **STRIJKERT, P.J., 1969.**- Arginine metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii :* on the regulation of the arginine biosynthesis. *Eur. J. Biochem., 8,* 403-412.

SVEDBERG, T. et **ERIKSSON, I.B., 1932.**- Molecular weights of phycoerythrin and phycocyanin. *J. Amer. Chem. Soc., 54,* 3998-4010.

SVEDBERG, T. et **KATSURAI, T., 1929.**- The molecular weight of phycoerythrin from *Porphyra tenera* and of phycocyan from *Aphanozomenon flosaquae. J. Amer. Chem. Soc., 51,* 3573-3583.

SVEDBERG, T. et **LEWIS, N.B., 1928.**- The molecular weights of phycoerythrin and phycocyan. *J. Amer. Chem. Soc., 50,* 525-536.

SYNGE, R.L.M., 1955.- Peptides (bound aminoacids) and free aminoacids. In : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. PEACH K. et TRACEY M.V. edts. Pringer Berlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg. Vol. 4, p. 1-22.

SYRETT, P.J., 1962.- Nitrogen assimilation. In : Physiology and Biochemistry of Algae. LEWIN R.A. edt. Academic Press. New York. London. p. 171-188.

TAKAGI, M. 1950.- Chemical studies on seaweeds. I. Protein content of the sea lettuce. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 1,* 35-43.

1951.- Chemical studies on seaweeds. II. The nitrogen distribution of *Porphyra* by kinds and seasons. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 2,* 31-42.

1952.- Chemical studies on marine Algae. V. Organic bases in *Porphyra pseudolinearis. Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 3,* 297-301.

1953.- Chemical studies on marine Algae. VII. Tyrosine and tryptophan contents in various species of marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 4,* 86-91.

1953.- Chemical studies on marine Algae. VIII. Threonine and serine contents. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 4,* 92-95.

1956.- Chemical studies on marine Algae. X. Free and combined aminoacids in marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 7,* 119-129.

1964.- A review on new amino and imino acids recently discovered in plants. *Tamp. Kakusan. Koso., 9,* 1-10.

TAKAGI, M., ISHIHARA, S., NISHIDE, H., YAMADA, Y. et **MURAYAMA, H., 1964.**- The free aminoacids of *Rhodomela larix and Chondrus ocellatus. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30,* 284-902.

TAKAGI, M., OISHI, K. et **OKUMURA, A., 1967.**- The free aminoacids of some species of marine Algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 33,* 669-673.

TAKAGI, M. et **OKUMURA, A., 1964.**- A new aminoacid, S-hydroxymethyl-L-homocystéine, isolated from *Chondrus ocellatus. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30,* 837-842.

TAKAGI, M. et **NAKAMURA, S., 1964.**- The free aminoacids of *Desmarestia ligulata. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30,* 279-283.

TAKAJI, M., 1951.- Chemical studies on seaweeds. The aminoacids of *Ulva pertusa, Enteromorpha linza* and *E.l.* var. *crispata. Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 1,* 77-80.

TAKAJI, M. et **MURATA, K. 1954.**- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation. I. On the measurement of nitrate reductase activity. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 4,* 296-305.

1954.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation. II. On the nitrate reductase activity in various species of marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 4,* 306-309.

1954.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation. III. Of the optimum pH of the nitrate reductase in some species of marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 4,* 310-313.

1954.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation. IV. On the optimum temperature of the nitrate reductase in some species of marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 5,* 173-175.

1954.- Studies on the nitrogen assimilation in marine Algae. V. On the hydrogen donator of nitrate reductase. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 5,* 176-182.

1955.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation in marine Algae. VI. The variation of nitrate reductase activity according to the portions of fronds length of some marine Algae. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 6,* 25-28.

1955.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation in marine Algae. VII. Effect of various inhibitors on nitrate reductase. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 6,* 29-32.

1955.- Studies on the mechanism of nitrogen assimilation in marine Algae. VIII. On the electron carrier of nitrate reductase in *Porphyra yezoensis. Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 6,* 33-36.

TAKAJI, M. et **SUZUKI, M., 1952.**- Chemical studies on marine Algae. IV. The aminoacids containing sulfur. *Bull. Fac. Fish. Hokk. Univ., 2,* 293-296.

TATEWAKI, M. et **PROVASOLI, L., 1964.**- Vitamin requirements of three species of *Antithamnion. Bot. mar., 6,* 194-203.

TAZAWA, Y. et **MIWA, A., 1953.**- Uber Algen proteinase. *Bot. Mag., Tokyo, 66,* 77-80.

TOCHER, R.D. et **CRAIGIE, J.S., 1966.**- Enzyme of marine Algae. II. Isolation and identification of 3-hydroxytyramine as the phenolase substrate in *Monostroma fuscum. Canad. J. Bot., 44,* 605-608.

TOCHER, R.D. et **MEUSE, B.J.D., 1966.**- Enzyme of marine Algae. I. Studies on phenolase in the green alga *Monostroma fuscum. Canad. J. Bot., 44,* 551-561.

TOGAZAWA, Y. et **MINE, T., 1954.**- Biochemical studies on marine Algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 20,* 189-192.

TOMINAGA, F. et **OKA, K., 1963.**- On the isolation and identification of l-4-thiazane-3-carboxylic acide S-oxide from the brown alga *Undaria pinnatifida. J. Biochem., 54,* 222-224.

TOUZE, A., 1964.- Métabolisme comparé de la citrulline dans les plantules de melons sains et atteints d'anthracnose. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét., 9,* 121-125.

1964.- Anthracnose du melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. *Thèse Doct. Sci. Nat.*. Toulouse.

TOUZE, A. et **AURIOL, P., 1967.**- Métabolisme comparé de l'ornithine dans les plantules de melons sains et atteints d'anthracnose. *C.R. Acad. Sci., 264,* 1615-1618.

TRACEY, M.V., 1955.- Urea and Ureids. In : Modern Methods of Plant Analysis PEACH K et TRACEY M.V. edts. Springer Verlag. Berlin. Vol. 4, p. 119-141.

TSUCHIYA, V. et **SASAKI, T., 1957.**- Studies of the savour of marine Algae. III. Content of free aminoacids in the laver *Porphyra tenera. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 23,* 230-233.

TURVEY, J.R., 1961.- Carbohydrates of *Porphyra umbilicalis*. In : Chimie et Physicochimie des principes immédiats tirés des Algues. Dinard 1960. Editions du CNRS, Paris. p. 29-37.

UDENFRIEND, S. et **PETERSON, R.E., 1957.**- Dosage du tryptophanne. In : Methods in Enzymology. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. edts. Academic Press. New York. Vol. 3, p. 613-614.

VAIDYA, B.S., 1962.- Aminoacids in *Chara brachypus* Braun. *J. Univ. Bombay, 29,* 151-153.

VARNER, J.E., 1960.- Urease. In : The Enzymes. BOYER P.D., LARDY H. et MYRBACH K. edts. Academic Press. New York. Vol. 4, p. 247-256.

VENTURA, M.M. et **HOLLANDA, L.I., 1961.**- Ornithine cycle aminoacids and other free aminoacids in fruits of *Annona squamosa* L. and *A. muricata. Phyton, 17,* 39-47.

VILLERET, S., 1955.- Sur la présence des enzymes des uréides glyoxyliques chez les Algues d'eau douce. *C.R. Acad. Sci., 211,* 90-92.

1958.- Recherches sur la présence des enzymes des uréides glyoxyliques chez les Algues marines. *C.R. Acad. Sci., 246,* 1452-1455.

1966.- Les constituants azotés de quelques Rhodophycées d'eau douce. I. Azote total et fraction aminée. *Bull. Soc. Sci. Bret., 41,* 289-297.

1967.- Recherches sur le métabolisme azoté des galles et des feuilles de hêtre parasitées par *Mikiolafagi* Hart. *Bull. Soc. Sci. Bret., 42,* 193-197.

VITRY, F. de, 1965.- Etude du métabolisme des acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea.* I, II et III. *Bull. Soc. Chim. Biol., 47,* 1325-1397.

VOGEL, H.J., 1953.- Path of ornithine synthesis in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci., 39,* 578-583.

VOGEL, H.J. et **BONNER, D.M., 1954.**- On the glutamate-proline-ornithine interrelation in *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci., 40,* 688-694.

VOGELS, G.D., 1963.- On the microbial metabolism of allantoin. *Thèse Doct.* Druk : V.R.B. Kleine Dor. A. 3-4. Groningen.

WAGNER, M., 1962.- Vergleichende Untersuchungen über das Vorkommen von freien und gebundenen Aminosäuren in Algen und Pilzen. *Zbl Bakteriol., Parasit. Infekt. Krom. Hyg., II, Dtsch., 15,* 50-65.

1962.- Untersuchungen über das Vorkommen von D-Aminosäuren in Algen und Pilzen. *Zbl Bakteriol., Parasit. Infekt, Krom. Hyg., II, Dtsch., 15,* 66-78.

WALKER, J.B., 1952.- Argininosuccinic acid from *Chlorella. Proc. Natl. Acad. Sci., 38,* 561-566.

WALKER, J.B. et **MYERS, J., 1953.**- Formation of argininosuccinic acid from arginine and fumarate. *J. Biol. Chem., 203,* 143-152.

WATANABE, A., 1947.- Uber die Dehydrazen von Meeresalgen. *Acta Phytochim. (Tokyo), 15,* 129.

WERZ, G., 1962.- Zur Frage des Elimination von Ribosenucleinsäure und Protein aus dem Zellkern von *Acetabularia mediterranea. Planta, 57,* 636-655.

1963.- Untersuchungen zur Frage der Elimination von Ribosenucleinsäure in das Cytoplasma bei *Gasteria verrucosa* und anderen Zellen. *Planta, 59,* 338-345.

1963.- Morphogenetische Wirkungen von Aminosäuren bei Acetabularien. I. Wirkungen von 3-C-aminosäuren und verwandten Derivaten. *Planta, 60,* 205-210.

1963.- Morphogenetische Wirkungen von Aminosäuren bei Acetabularien. II. Die Beeinflussung der Morphogenese durch einige 4-C-Aminosäuren. *Planta, 60,* 211-215.

WHYTE, J.N.C. et **SOUTHSCOTT, B.A., 1970.**- An extraction procedure for plants plants : extracts from the red alga *Rhodomela larix. Phytochem., 9,* 1159-1161.

WILKOSZEWSKA, I., KLECZKOWSKI, K. et **REIFER, I., 1961.**- Ornithine transcarbamylase in acetone powder extracts from pea seedlings. *Bull. Acad. Polon. Sci., 9,* 1-5.

YOCUM, C.S. et **BLINKS, L.R., 1954.**- Photosynthetic efficiency of marine plants. *J. Gen. Physiol., 38,* 1-16.

YOUNG, E.G., 1963.- Nucleic acids of seaweeds. *Proc. Canad. Fed. Biol. Soc., 6,* 64.

1964.- The concentration of nucleic acids in some common marine Algae. *Canad. J. Bot., 42,* 1471-1479.

1970.- A comparison of the soluble proteins in various species of algae, by disc electrophoresis in polyacrylamide gels. *Phytochem., 9,* 2167-2174.

YOUND, E.G. et **SMITH, D.G., 1958.**- Aminoacids, peptides and proteins of Irish Moss, *Chondrus crispus. J. Biol. Chem., 233,* 406-410.

TABLES DES MATIERES

Pages

Introduction 3

PREMIERE PARTIE

LA COMPOSITION AZOTEE DES ALGUES MARINES
des côtes Nord de la Bretagne

CHAPITRE I
MATERIEL ET TECHNIQUES

A. - LE MATERIEL VEGETAL 13

1. - Lieux des récoltes 13
2. - Récoltes 13
3. - L'échantillon 15
4. - Préparation du matériel 21
5. - Les Algues étudiées 22

B. - LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. - Dosage de l'azote total 27
2. - Dosage de l'azote soluble 27
3. - Dosage de l'azote ammoniacal 28
4. - Dosage de l'azote nitrique 30
5. - Dosage de l'azote nitreux 30
6. - Chromatrographie sur papier 30
7. - Dosage des acides aminés libres 30
8. - Dosage des acides aminés combinés 34
9. - Expression des résultats 35

CHAPITRE II

LA COMPOSITION AZOTEE

Pages

A. - LES DIFFERENTES FRACTIONS AZOTEES 36

1. - La fraction azotée totale 36

2. - La fraction azotée soluble 43

3. - L'azote minéral 44

a. - L'azote ammoniacal 44

b. - L'azote nitreux 45

c. - L'azote nitrique 45

4. - La fraction aminée libre 48

a. - Les Chlorophycées 52

b. - Les Phéophycées 56

c. - Les Rhodophycées 64

5. - Les acides aminés des hydrolysats de la fraction azotée insoluble 76

B. - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS 81

DEUXIEME PARTIE

LE METABOLISME DE LA CITRULLINE

chez *Polysiphonia lanosa*

Introduction 92

CHAPITRE I

LA SYNTHESE DE LA CITRULLINE

A. - ABSORPTION D'ORNITHINE ET D'ARGININE 98

1. - Maintien de *Polysiphonia lanosa* en milieu non renouvelé 101

2. - Absorption d'ornithine et d'arginine 106

Pages

B. - ABSORPTION D'ORNITHINE RADIOACTIVE 108

1. - Protocole expérimental 108

2. - Résultats et commentaires 110

C. - ETUDE ENZYMATIQUE 112

1. - Les difficultés de l'étude enzymatique 112

a. - Mise en évidence d'une action inhibitrice 112
b. - Essais pratiqués pour lever l'inhibition 115

2. - Essai d'isolement des protéines enzymatiques 118

3. - Etude des enzymes 122

a. - L'arginase 122
b. - L'uréase 123
c. - L'ornithine transcarbamylase 124
d. - L'arginine désimidase 125

4. - Résultats et commentaires 126

CHAPITRE II

DEGRADATION DE LA CITRULLINE

A. - ABSORPTION DE CITRULLINE MARQUEE 128

1. - Protocole expérimental 128

2. - Résultats et commentaires 132

B. - ETUDE ENZYMATIQUE 138

1. - Etude des enzymes 139

a. - L'arginine synthétase 139
b. - La citrullinase 141
c. - Les transaminases 142

2. - Résultats 143

CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE 144

Pages

CONCLUSIONS GENERALES 149

BIBLIOGRAPHIE 152

VU :

Le Président de la Thèse

S. VILLERET

VU :

Le Directeur de la Thèse

S. VILLERET

VU et APPROUVE

Rennes, le 1er Mars 1971

Le Directeur de l'U.E.R.
Sciences du Comportement et
de l'Environnement,

S. VILLERET

VU et PERMIS D'IMPRIMER

n° 68 A

Rennes, le 22 Mars 1971

Le Président de l'Université de Rennes,

C. CHAMPAUD